

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公表特許公報 (A)

(11) 特許出願公表番号
特表2002-520000
(P2002-520000A)

(43) 公表日 平成14年7月9日(2002.7.9)

(51) Int.Cl. ⁷	識別記号	F I	テーマコード(参考)
C 1 2 N 15/09	Z N A	A 6 1 K 31/711	4 B 0 2 4
A 6 1 K 31/711		39/00	H 4 C 0 8 5
39/00		39/12	4 C 0 8 6
39/12		39/21	
39/21		39/29	
審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全 160 頁) 最終頁に続く			

(21) 出願番号	特願2000-548449(P2000-548449)	(71) 出願人	エビミューン, インコーポレイテッド
(86) (22) 出願日	平成11年5月13日(1999.5.13)		アメリカ合衆国 カリフォルニア 92121,
(85) 翻訳文提出日	平成12年11月10日(2000.11.10)		サン ディエゴ, ナンシー リッジ
(86) 国際出願番号	P C T / U S 9 9 / 1 0 6 4 6		ドライブ 5820, スイート 100
(87) 国際公開番号	W O 9 9 / 5 8 6 5 8	(72) 発明者	ファイクス, ジョン ディー,
(87) 国際公開日	平成11年11月18日(1999.11.18)		アメリカ合衆国 カリフォルニア 92122,
(31) 優先権主張番号	0 9 / 0 7 8 , 9 0 4		サン ディエゴ, リップマン ストリート 6474
(32) 優先日	平成10年5月13日(1998.5.13)	(72) 発明者	ハーマンソン, ゲイリー ジー,
(33) 優先権主張国	米国 (U S)		アメリカ合衆国 カリフォルニア 92024,
(31) 優先権主張番号	6 0 / 0 8 5 , 7 5 1		エンシニタス, ピア デ カパロ
(32) 優先日	平成10年5月15日(1998.5.15)		3159
(33) 優先権主張国	米国 (U S)	(74) 代理人	弁理士 山本 秀策
最終頁に続く			

(54) 【発明の名称】 免疫応答を刺激するための発現ベクターおよびそのベクターの使用方法

(57) 【要約】

本発明は、複数のCTLエピトープおよびHTLエピトープ、ならびにMHC標的化配列をコードする核酸ワクチンに関する。

【特許請求の範囲】

【請求項1】 主要組織適合性（MHC）標的化配列をコードする第1のヌクレオチド配列に作動可能に連結されたプロモーターを含む発現ベクターであって、該第1のヌクレオチド配列は2つ以上の異種ペプチドエピトープをコードする第2のヌクレオチド配列に融合され、ここで該異種ペプチドエピトープは、2つのHTLペプチドエピトープまたはCTLペプチドエピトープおよびユニバーサルHTLペプチドエピトープを含む、ベクター。

【請求項2】 前記異種ペプチドエピトープが2つ以上の異種HTLペプチドエピトープを含む、請求項1に記載の発現ベクター。

【請求項3】 前記異種ペプチドエピトープがCTLペプチドエピトープおよびユニバーサルHTLペプチドエピトープを含む、請求項1に記載の発現ベクター。

【請求項4】 前記異種ペプチドエピトープがさらに1つ以上のCTLペプチドエピトープを含む、請求項2に記載の発現ベクター。

【請求項5】 前記異種ペプチドエピトープがさらに2つ以上のCTLペプチドエピトープを含む、請求項3に記載の発現ベクター。

【請求項6】 前記異種ペプチドエピトープがさらに2つ以上のHTLペプチドエピトープを含む、請求項3に記載の発現ベクター。

【請求項7】 前記HTLペプチドエピトープの1つがユニバーサルHTLエピトープである、請求項2に記載の発現ベクター。

【請求項8】 前記ユニバーサルHTLエピトープが汎DRエピトープである、請求項3または7に記載の発現ベクター。

【請求項9】 前記汎DRエピトープが、配列AlaLysPheValAlaAlaAlaTrpThrLeuLysAlaAlaAla（配列番号38）を有する、請求項8に記載の発現ベクター。

【請求項10】 前記ペプチドエピトープが、B型肝炎ウイルスエピトープ、C型肝炎ウイルスエピトープ、ヒト免疫不全ウイルスエピトープ、ヒトパピローマウイルスエピトープ、MAGEエピトープ、PSAエピトープ、PSMエピトープ、PAPエピトープ、p53エピトープ、CEAエピトープ、Her2／

neue エピトープ、または Plasmodium エピトープである、請求項1に記載の発現ベクター。

【請求項11】 前記ペプチドエピトープが表1～8に表されるペプチドからなる群より選択される配列を各々有する、請求項10に記載の発現ベクター。

【請求項12】 少なくとも1つの前記ペプチドエピトープが、表1～8に示されるペプチドのアナログである、請求項11に記載の発現ベクター。

【請求項13】 前記MHC標的化配列が、I i タンパク質、LAMP-I、HLS-DM、HLA-DO、H2-DO、インフルエンザマトリックスタンパク質、B型肝炎表面抗原、B型肝炎ウイルスコア抗原、Ty粒子、Ig- α タンパク質、Ig- β タンパク質、およびIg κ 鎖シグナル配列からなる群より選択されるポリペプチドの一領域を含む、請求項1に記載の発現ベクター。

【請求項14】 前記発現ベクターが、第2のプロモーター配列をさらに含み、該プロモーター配列は1つ以上の異種HTLペプチドエピトープまたは異種CTLペプチドエピトープをコードする第3のヌクレオチド配列に作動可能に連結されている、請求項1に記載の発現ベクター。

【請求項15】 前記ベクターがpMin1またはpEP2を含む、請求項1に記載の発現ベクター。

【請求項16】 前記CTLペプチドエピトープが、HLAスーパータイプについての構造モチーフを含み、それによって該CTLペプチドエピトープは、500nMより大きいアフィニティーで該スーパータイプの2つ以上のメンバーに結合する、請求項3または4に記載の発現ベクター。

【請求項17】 前記CTLペプチドエピトープが、1つより多くのHLA対立遺伝子スーパータイプについての結合アフィニティーを提供する構造モチーフを含む、請求項4または5に記載の発現ベクター。

【請求項18】 インビボで免疫応答を誘導する方法であって、該方法は、主要組織適合性(MHC)標的化配列をコードする第1のヌクレオチド配列に作動可能に連結されたプロモーターを含む発現ベクターを、哺乳動物被験体に投与する工程であって、該第1のヌクレオチド配列は2つ以上の異種ペプチドエピトープをコードする第2のヌクレオチド配列に融合され、ここで該異種ペプチドエ

ピトープは、2つのHTLペプチドエピトープまたはCTLペプチドエピトープおよびユニバーサルHTLペプチドエピトープを含む、工程を包含する、方法。

【請求項19】 前記異種ペプチドエピトープが2つ以上の異種HTLペプチドエピトープを含む、請求項18に記載の方法。

【請求項20】 前記異種ペプチドエピトープがCTLペプチドエピトープおよびユニバーサルHTLペプチドエピトープを含む、請求項18に記載の方法。

【請求項21】 前記異種ペプチドエピトープがさらに1つ以上のCTLペプチドエピトープを含む、請求項19に記載の方法。

【請求項22】 前記異種ペプチドエピトープがさらに2つ以上のCTLペプチドエピトープを含む、請求項20に記載の方法。

【請求項23】 前記異種ペプチドエピトープがさらに2つ以上のHTLペプチドエピトープを含む、請求項20に記載の方法。

【請求項24】 前記HTLペプチドエピトープがユニバーサルHTLエピトープである、請求項19に記載の方法。

【請求項25】 前記ユニバーサルHTLエピトープが汎DRエピトープである、請求項20または24に記載の方法。

【請求項26】 前記汎DRエピトープが、配列AlaLysPheValAlaAlaAlaTrpThrLeuLysAlaAlaAla（配列番号38）を有する、請求項25に記載の方法。

【請求項27】 前記ペプチドエピトープが、B型肝炎ウイルスエピトープ、C型肝炎ウイルスエピトープ、ヒト免疫不全ウイルスエピトープ、ヒトパピローマウイルスエピトープ、MAGEエピトープ、PSAエピトープ、PAPエピトープ、PSMエピトープ、p53エピトープ、CEAエピトープ、Her2/neuエピトープ、またはPlasmodiumエピトープである、請求項18に記載の方法。

【請求項28】 前記ペプチドエピトープが表1～8に表されるペプチドからなる群より選択される配列を各々有する、請求項27に記載の方法。

【請求項29】 少なくとも1つの前記ペプチドエピトープが、表1～8に

表されるペプチドのアナログである、請求項28に記載の方法。

【請求項30】 前記MHC標的化配列が、I iタンパク質、LAMP-I、HLS-DM、HLA-DO、H2-DO、インフルエンザマトリックスタンパク質、B型肝炎表面抗原、B型肝炎ウイルスコア抗原、Ty粒子、Ig- α タンパク質、Ig- β タンパク質、およびIg κ 鎖シグナル配列からなる群より選択されるポリペプチドの一領域を含む、請求項18に記載の方法。

【請求項31】 前記発現ベクターが、第2のプロモーター配列をさらに含み、該プロモーター配列は1つ以上の異種HTLペプチドエピトープまたは異種CTLペプチドエピトープをコードする第3のヌクレオチド配列に作動可能に連結されている、請求項18に記載の方法。

【請求項32】 前記ベクターがpMin.1またはpEP2を含む、請求項18に記載の方法。

【請求項33】 前記CTLペプチドエピトープが、HLAスーパータイプについての構造モチーフを含み、それによって該ペプチドエピトープは、500nMより大きいアフィニティーで該スーパータイプの2つ以上のメンバーに結合する、請求項20または21に記載の方法。

【請求項34】 前記CTLペプチドエピトープが、1つより多くのHLA対立遺伝子スーパータイプについての結合アフィニティーを提供する構造モチーフを含む、請求項21または22に記載の方法。

【請求項35】 インビボで免疫応答を誘導する方法であって、該方法は、主要組織適合性(MHC)標的化配列をコードする第1のヌクレオチド配列に作動可能に連結されたプロモーターを含む発現ベクターを、哺乳動物被験体に投与する工程であって、該第1のヌクレオチド配列は、異種ヒトHTLペプチドエピトープをコードする第2のヌクレオチド配列に融合されている、工程、を包含する、方法。

【請求項36】 前記第2のヌクレオチド配列がさらに2つ以上の異種HTLペプチドエピトープを含む、請求項35に記載の方法。

【請求項37】 前記第2のヌクレオチド配列がさらに1つ以上の異種CTLペプチドエピトープを含む、請求項35に記載の方法。

【請求項38】 前記HTLペプチドエピトープがユニバーサルHTLペプチドエピトープである、請求項35に記載の方法。

【請求項39】 前記ユニバーサルHTLエピトープが汎DRエピトープである、請求項38に記載の方法。

【請求項40】 前記汎DRエピトープが、配列AlaLysPheValAlaAlaTrpThrLeuLysAlaAlaAla（配列番号38）を有する、請求項39に記載の方法。

【請求項41】 前記HTLペプチドエピトープおよびCTLペプチドエピトープが、B型肝炎ウイルスエピトープ、C型肝炎ウイルスエピトープ、ヒト免疫不全ウイルスエピトープ、ヒトパピローマウイルスエピトープ、MAGEエピトープ、PSAエピトープ、PAPエピトープ、PSMエピトープ、p53エピトープ、CEAエピトープ、Her2/neuエピトープ、またはPlasmodiumエピトープである、請求項37に記載の方法。

【請求項42】 前記ペプチドエピトープが表1～8に表されるペプチドからなる群より選択される配列を各々有する、請求項41に記載の方法。

【請求項43】 少なくとも1つの前記ペプチドエピトープが、表1～8に表されるペプチドのアナログである、請求項42に記載の方法。

【請求項44】 前記MHC標的化配列が、Iiタンパク質、LAMP-1、HLS-DM、HLA-DO、H2-DO、インフルエンザマトリックスタンパク質、B型肝炎表面抗原、B型肝炎ウイルスコア抗原、Ty粒子、Ig- α タンパク質、Ig- β タンパク質、およびIg κ 鎖シグナル配列からなる群より選択されるポリペプチドの一領域を含む、請求項35に記載の方法。

【請求項45】 前記発現ベクターが、第2のプロモーター配列をさらに含み、該プロモーター配列は1つ以上の異種HTLペプチドエピトープまたは異種CTLペプチドエピトープをコードする第3のヌクレオチド配列に作動可能に連結されている、請求項35に記載の方法。

【請求項46】 前記CTLペプチドエピトープが、HLAスーパータイプについての構造モチーフを含み、それによって該ペプチドエピトープは、500nMより大きいアフィニティーで該スーパータイプの2つ以上のメンバーに結合

する、請求項37に記載の方法。

【請求項47】 前記CTLペプチドエピトープが、1つより多くのHLA対立遺伝子スーパータイプについての結合アフィニティを提供する構造モチーフを含む、請求項37に記載の方法。

【請求項48】 非ヒト哺乳動物においてインビボでヒトT細胞ペプチドエピトープのヒトの免疫原性をアッセイする方法であって、該方法は、異種ヒトCTLペプチドエピトープまたは異種ヒトHTLペプチドエピトープをコードする第1のヌクレオチド配列に作動可能に連結されたプロモーターを含む発現ベクターを、該非ヒト哺乳動物に投与する工程を包含する、方法。

【請求項49】 前記第1のヌクレオチド配列が2つ以上の異種CTLペプチドエピトープまたは異種HTLペプチドエピトープをコードする、請求項48に記載の方法。

【請求項50】 前記非ヒト哺乳動物が、ヒトHLA対立遺伝子を発現するトランスジェニックマウスである、請求項48に記載の方法。

【請求項51】 前記ヒトHLA対立遺伝子がA11およびA2.1からなる群より選択される、請求項50に記載の方法。

【請求項52】 前記発現ベクターが、主要組織適合性(MHC)標的化配列をコードする第2のヌクレオチド配列をさらに含む、請求項48に記載の方法。

【請求項53】 前記HTLペプチドエピトープがユニバーサルHTLエピトープである、請求項48に記載の方法。

【請求項54】 前記ユニバーサルHTLエピトープが汎DRエピトープである、請求項53に記載の方法。

【請求項55】 前記汎DRエピトープが、配列AlaLysPheValAlaAlaAlaTrpThrLeuLysAlaAlaAla(配列番号38)を有する、請求項54に記載の方法。

【請求項56】 前記CTLペプチドエピトープおよびHTLペプチドエピトープが、B型肝炎ウイルスエピトープ、C型肝炎ウイルスエピトープ、ヒト免疫不全ウイルスエピトープ、ヒトパピローマウイルスエピトープ、MAGEエピ

トープ、P S Aエピトープ、P S Mエピトープ、P A Pエピトープ、p 5 3エピトープ、C E Aエピトープ、H e r 2 / n e uエピトープ、またはP l a s m o d i u mエピトープである、請求項48に記載の方法。

【請求項57】 前記C T LペプチドエピトープまたはH T Lペプチドエピトープが表1～8に表されるペプチドからなる群より選択される配列を各々有する、請求項56に記載の方法。

【請求項58】 少なくとも1つの前記ペプチドエピトープが、表1～8に表されるペプチドのアナログである、請求項57に記載の方法。

【請求項59】 前記M H C標的化配列が、I i タンパク質、L A M P - I、H L S - D M、H L A - D O、H 2 - D O、インフルエンザ、B型肝炎ウイルスコア抗原、T y粒子、I g - α タンパク質、I g - β タンパク質、およびI g κ 鎖シグナル配列からなる群より選択されるポリペプチドの一領域を含む、請求項52に記載の方法。

【請求項60】 前記発現ベクターが、第2のプロモーター配列をさらに含み、該プロモーター配列は1つ以上の異種ヒトC T Lペプチドエピトープまたは異種ヒトH T Lペプチドエピトープをコードする第3のヌクレオチド配列に作動可能に連結されている、請求項48に記載の方法。

【請求項61】 前記ベクターがp M i n. 1またはp E P 2を含む、請求項48に記載の方法。

【請求項62】 前記C T Lペプチドエピトープが、H L A対立遺伝子スーパータイプについての結合アフィニティーを提供する構造モチーフを有する、請求項48に記載の方法。

【請求項63】 前記C T Lペプチドエピトープが、1つより多くのH L A対立遺伝子スーパータイプについての結合アフィニティーを提供する構造モチーフを有する、請求項49に記載の方法。

【請求項64】 前記発現ベクターが、H T LペプチドエピトープおよびC T Lペプチドエピトープの両方を含む、請求項48に記載の方法。

【発明の詳細な説明】**【0001】**

(関連出願の引用)

本出願は、09/078,904（1998年5月13日出願）、および60/085,751（1998年5月15日出願）（両方が、それらの全体において本明細書中で参考として援用される）の利益を主張する。

【0002】

(連邦政府に援助された研究および開発の下でなされた発明に対する権利に関する記述)

本発明は、NIH助成金番号AI-42699-01、NIH助成金番号AI38584-03、およびNIH契約番号N01-AI-45241の下での政府の援助によりなされた。政府は、本発明に特定の権利を有する。

【0003】

(発明の分野)

本発明は、複数のCTLエピトープおよびHTLエピトープをコードする核酸ワクチンおよびMHC標的化配列に関する。

【0004】

(発明の背景)

ワクチンは、近代医学において基本的に重要であり、そして特定のヒト疾患と闘う際に非常に効果的であった。しかし、いくつかの衰弱性ヒト疾患を大いに制限したかまたは実質的に排除したワクチンプログラムの首尾よい実行にも関わらず、効果的なワクチンが開発されていない、世界全体で数百万人が罹患する多くの疾患が存在する。

【0005】

免疫学の分野における主要な進歩は、免疫応答に関与する機構のより多くの理解を導き、そして新しいワクチン接種ストラテジーの開発に洞察を提供した(Kuby, Immunology, 443~457 (第3版、1997) これは、本明細書中で参考として援用される)。これらの新しいワクチンストラテジーは、外来物質（抗原と呼ばれる）が免疫系により認識され、そして生物から排除さ

れる、機構に関して得られた知識を利用した。効果的なワクチンは、目的の抗原に対して免疫応答を誘発するワクチンである。

【0006】

免疫系の分化した細胞は、疾患と闘うために必要とされる保護活性を担う。免疫応答は、2つの主要な群の細胞（リンパ球、すなわち白血球、および抗原提示細胞）を含む。これらの免疫応答細胞の目的は、外来物質（例えば、感染性生物または癌細胞）を認識し、そしてその外来物質を生物から除去することである。

【0007】

2つの主要な型のリンパ球は、免疫応答の異なる局面を媒介する。B細胞は、それらの細胞表面上に特異的タンパク質（抗体と呼ばれる）を表示し、この抗体は、外来物質（抗原と呼ばれる）と特異的に結合する。エフェクターB細胞は、身体全体を循環し、そして生物から抗原を排除するように機能する、可溶性形態の抗体を産生する。免疫系のこの分枝は、液性分枝として公知である。記憶B細胞は、抗体の膜結合形態を発現し続けることによって、将来的な遭遇において抗原を認識するように機能する。

【0008】

第2の主要な型のリンパ球は、T細胞である。T細胞はまた、それらの細胞表面上に特異的タンパク質を有し、この特異的タンパク質は、抗原を認識するが、B細胞では対照的に、抗原が、抗原提示細胞の表面上の特異的膜タンパク質複合体である主要組織適合性遺伝子複合体（MHC）に結合されることを必要とする。2つの主要なクラスのT細胞（ヘルパーTリンパ球（「HTL」）および細胞傷害性Tリンパ球（「CTL」）と呼ばれる）は、細胞表面上での、それぞれ、CD4タンパク質またはCD8タンパク質のいずれかの存在に基づいて、しばしば区別される。免疫系のこの分枝は、細胞媒介性分枝として公知である。

【0009】

第2の主要なクラスの免疫応答細胞は、抗原提示細胞において発現されるMHC分子に結合するための抗原をプロセスすることによって、抗原提示において機能する細胞である。MHC分子に結合したプロセスされた抗原は、細胞の表面に運ばれ、ここでこの抗原-MHC複合体は、T細胞に結合するために利用可能で

ある。

【0010】

MHC分子は、MHCクラスIおよびMHCクラスII分子に分類され得、そして2つのクラスのT細胞により認識される。ほとんど全ての細胞は、細胞傷害性Tリンパ球に抗原を提示するように機能する、MHCクラスI分子を発現する。細胞傷害性Tリンパ球は、代表的には、MHCクラスIに結合した抗原を認識する。抗原提示細胞と呼ばれる細胞のサブセットは、MHCクラスII分子を発現する。ヘルパーTリンパ球は、代表的には、MHCクラスII分子に結合した抗原を認識する。抗原提示細胞としては、樹状細胞、マクロファージ、B細胞、線維芽細胞、グリア細胞、膵 β 細胞、胸腺上皮細胞、甲状腺上皮細胞、および血管内皮細胞が挙げられる。これらの抗原提示細胞は、一般に、MHCクラスI分子およびMHCクラスII分子の両方を発現する。また、B細胞は、抗体産生細胞および抗原提示細胞の両方として機能する。

【0011】

一旦、ヘルパーTリンパ球が抗原提示細胞の表面上の抗原-MHCクラスII複合体を認識すると、ヘルパーTリンパ球は、活性化し、そして免疫応答に関与する種々の細胞（B細胞および細胞傷害性Tリンパ球を含む）を活性化する増殖因子を産生する。例えば、活性化したヘルパーTリンパ球により発現される増殖因子の影響下で、抗原-MHCクラスII複合体を認識する細胞傷害性Tリンパ球は活性化する。CTLは、CTLにより特異的に認識される抗原を表示する細胞（例えば、感染した細胞または腫瘍細胞）をモニターし、そして排除する。従って、ヘルパーTリンパ球の活性化は、免疫系の液性分枝および細胞媒介性分枝の両方の活性化を刺激する。

【0012】

免疫応答の重要な局面（特に、この局面がワクチン効力に関する場合は、抗原がプロセスされ、その結果、抗原が免疫系の分化した細胞により認識され得る様式である。異なる抗原プロセッシングおよび抗原提示経路が利用される。1つは、サイトゾル経路であり、この経路は、MHCクラスI分子に結合される抗原を生じる。代替的な経路は、サイトゾルをバイパスする小胞体経路である。別の経

路は、MHCクラスII分子に結合される抗原を生じるエンドサイトーシス経路である。従って、MHCクラスII分子またはMHCクラスI分子による、それぞれ、ヘルパーTリンパ球または細胞傷害性Tリンパ球への特定の抗原の細胞表面の提示は、その抗原に関するプロセッシング経路に依存する。

【0013】

サイトゾル経路は、細胞内部に発現される内因性抗原をプロセスする。この抗原は、細胞のサイトゾル中の特異的プロテアーゼ複合体により分解され、そして得られた抗原ペプチドは、小胞体（細胞表面分子をプロセスするオルガネラ）中に輸送される。小胞体において、抗原ペプチドは、MHCクラスI分子に結合し、次いで免疫系の細胞傷害性Tリンパ球への提示のために細胞表面に輸送される。

【0014】

細胞の外部に存在する抗原は、エンドサイトーシス経路によってプロセスされる。このような抗原は、エンドサイトーシス（これは、抗原がエンドソームと呼ばれる特定化された小胞中に、続いてリソソームと呼ばれる特定化された小胞へ運搬される）により細胞中に運ばれ、ここで抗原は、プロテアーゼによって、MHCクラスII分子に結合する抗原ペプチドに分解される。次いで、抗原ペプチド-MHCクラスII分子複合体は、免疫系のヘルパーTリンパ球への提示のために細胞表面に輸送される。

【0015】

種々の因子は、効果的なワクチンの開発に考慮されなければならない。例えば、免疫系の液性分枝または細胞媒介性分枝のいずれかの活性化の程度は、特定の疾患に対するワクチンの有効性を決定し得る。さらに、記憶細胞形成を誘導することによる免疫学的な記憶の発生は、特定の疾患に対して効果的なワクチンに重要であり得る（Kuby、前出）。例えば、短いインキュベーション期間で病原体（例えば、インフルエンザウイルス）により引き起こされる感染性疾患からの保護は、液性分枝により生成された高レベルの中和抗体を必要とする。なぜなら、疾患症状は、既に、記憶細胞が活性化される前に進行しているからである。あるいは、長いインキュベーション期間で病原体（例えば、ポリオウイルス）によ

り引き起こされる感染性疾患からの保護は、感染時に中和抗体を必要としないが、代わりに標的組織に感染し得る前に病原体と闘うために、中和抗体を生成し得る記憶B細胞を必要とする。従って、特定の疾患の症状を予防または寛解するワクチンの有効性は、ワクチンにより生じる免疫応答の型に依存する。

【0016】

多くの伝統的なワクチンは、免疫応答を誘発するインタクトな病原体（例えば、弱毒化ウイルスもしくは不活性化ウイルスまたは弱毒化細菌もしくは不活性化細菌）に依存した。しかし、これらの伝統的なワクチンは、長所および短所（有毒形態への弱毒化した病原体の復帰を含む）を有する。弱毒化ワクチンの復帰の問題は、病原体全体ではなく病原体の分子の使用によって取り組まれている。例えば、免疫アプローチは、組換えベクターワクチンおよび合成ペプチドワクチンを組み込むように開始した（K u b y、前出）。最近、DNAワクチンもまた、使用されている（D o n n e l l yら、A n n u . R e v . I m m u n o l . 15:617~648（1997）、これは、本明細書中に参考として援用される）。病原体分子の使用は、ワクチンの有毒形態への復帰についての可能性を回避する安全なワクチンを提供する。

【0017】

ヘルパーTリンパ球を活性化する、MHCクラスII分子への抗原の標的化は、記載されており、これは、リソソーム標的化配列を使用して、抗原をリソソームに指向し、ここでこの抗原は、リソソームプロテアーゼによって、MHCクラスII分子に結合する抗原ペプチドに分解される（米国特許第5,633,234号；T h o m s o nら、J . V i r o l . 72:2246~2252（1998））。これは、生物全体ではなく病原体の個々のエピトープを投与することによって安全に提供されることを活用しつつ、複数の抗原を送達するワクチンを開発することに有利である。特に、これは、ヘルパーTリンパ球の活性化のために、MHCクラスII分子に抗原を効果的に標的化するワクチンを開発することに有利である。

【0018】

いくつかの研究はまた、免疫系による感染性疾患および癌の産生および根治の

両方において、細胞傷害性T細胞の重要な役割を指摘する（B y m e ら、J . I m m u n o l . 5 1 : 6 8 2 （1984）；M c M i c h a e l ら、N . E n g l . J . M e d . 3 0 9 : 1 3 （1983））。組換えタンパク質ワクチンは、CTL応答を確実に誘導せず、そしてヒトにおいて弱毒化病原体からなる別の免疫原性ワクチンの使用は、いくつかの重要な疾患の場合には、安全な関心を優先させることによって、妨げられる。H I V、H B V、H C V、およびマラリアのような疾患の場合には、変異による逸脱を阻止し、そして標的病原体の異なる単離物に対して変動するワクチンの効力を克服するために、強力なCTL応答を誘導するのみではなく、高度に保存されたエピトープに対する応答に焦点を当てることもまた、所望されるようである。

【0019】

複数のエピトープに対して同時に指向される広範な応答の誘導はまた、効果的なワクチンの開発に重要であるようである。H I V感染は、おそらく、最も良好な例であり、ここで感染した宿主は、多重特異的な応答を有益とし得る。H I V感染の迅速な進行は、狭く焦点を合わせたCTL応答が誘導されるが、非プログレッサー（nonprogressor）がより広範な特異性のCTLを示しがちである場合において報告されている（G o u l d e r ら、N a t . M e d . 3 : 2 1 2 （1997）；B o r r o w ら、N a t . M e d . 3 : 2 0 5 （1997））。高度に変異しているゲノムおよび単一のエピトープまたはわずかなエピトープのみに対して指向されるCTL応答による選択から生じる、高度に変動する性質のH I V CTLエピトープはまた、広範なエピトープCTL応答についての必要性を支持する（M c M i c h a e l ら、A n n u . R e v . I m m u n o l . 1 5 : 2 7 1 （1997））。

【0020】

保存されたエピトープに対する多重特異的応答を誘導する、1つの可能性のアプローチは、ストリングオブビーズ（string-of-beads）様式においてエピトープをコードするミニ遺伝子プラスミドでの免疫である。ミニ遺伝子プラスミドによるマウスにおけるCTL応答、HTL応答、およびB細胞応答の誘導は、11の多さの程度のエピトープをコードする構築物を使用するいくつか

の実験室手順により記載されている (Anら、J. Virol. 71:2292 (1997); Thomsonら、J. Immunol. 157:822 (1996); Whitttonら、J. Virol. 67:348 (1993); Hankeら、Vaccine 16:426 (1998); Vitellioら、Eur. J. Immunol. 27:671~678 (1997))。ミニ遺伝子は、組換えアデノウイルスまたはワクシニアでの感染によってか、または筋肉内経路または皮内経路を介する精製DNAの注射によって、インビボで送達されている (Thomsonら、J. Immunol. 160:1717 (1998); Toesら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 94:14660 (1997))。

【0021】

ヒトでの使用のためのミニ遺伝子DNAワクチンの首尾よい開発は、エピトープMHCアフィニティー、インビボでの最大の免疫原性のための構築物の最適化、および多重エピトープミニ遺伝子構築物のインビボでの効力を試験するためのアッセイの開発を扱う特定の基本的な疑問に取り組むことを必要とする。エピトープのMHC結合アフィニティーに関して、高いアフィニティーまたは低いアフィニティーの両方のエピトープが単一のミニ遺伝子構築物内に含まれ得るか否か、およびどの範囲のペプチドアフィニティーがインビボでのCTL誘導に許容可能であるかは、現在公知ではない。これは、特に重要である。なぜなら、ドミナントエピトープは、それらのアフィニティーを変化し得るからであり、そしてなぜなら、高いMHC結合アフィニティーおよび低いMHC結合アフィニティーにより特徴付けられるドミナントエピトープおよびサブドミナントエピトープの混合物を送達し得ることが重要であり得る。

【0022】

インビボでの最大の免疫原性に対するミニ遺伝子構築物の最適化に関して、所定の構築物におけるエピトープの正確な位置または隣接領域、ヘルパーT細胞のエピトープ、およびシグナル配列の存在がCTL誘導に重要であり得るか否かに関して、矛盾するデータが存在する (Del Valら、Cell 66:1145 (1991); Bergmannら、J. Virol. 68:5306 (1

994) ; Thomsonら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA
 92:5845 (1995) ; Shiraiら、J. Infect. Dis.
 173:24 (1996) ; Rahemtullaら、Nature 353:
 180 (1991) ; Jenningsら、Cell. Immunol. 133:
 234 (1991) ; Andersonら、J. Exp. Med. 174:4
 89 (1991) ; Ugerら、J. Immunol. 158:685 (199
 7))。最後に、ヒトワクチン候補物の試験を可能にするアッセイの開発に関し
 て、現在までに、多重エピトープのミニ遺伝子プラスミドの全てのインビボでの
 免疫原性データは、マウスのクラスI MHC制限エピトープで実行されている
 ことが留意されるべきである。これは、従来の動物モデル系において、ヒトCTL
 エピトープを含むミニ遺伝子のインビボ免疫原性を試験し得ることに有利であ
 る。

【0023】

従って、免疫応答を刺激する、種々のHTL（ヘルパーTリンパ球）抗原およ
 びCTL（細胞傷害性Tリンパ球）抗原を効果的に送達する方法を開発する必要
 性が存在する。本発明は、この必要性を満たし、そして同様に関連する利点を提
 供する。

【0024】

（発明の要旨）

従って、本発明は、MHCクラスII標的化配列に融合した2以上のHTLエ
 ピトープをコードする発現ベクター、およびMHCクラスI標的化配列に融合し
 たCTLエピトープおよびユニバーサルHTLエピトープをコードする発現ベク
 ターを提供する。HTLエピトープは、ユニバーサルHTLエピトープであり得
 る（ユニバーサルMHCクラスIIエピトープとも言われる）。本発明はまた、
 MHCクラスII標的化配列に融合した2以上のHTLエピトープをコードし、
 かつ1以上のCTLエピトープをコードする発現ベクターを提供する。本発明は
 さらに、非ヒト哺乳動物において、インビボで本発明の発現ベクターを投与す
 ることによって免疫応答を刺激する方法、およびインビボでヒトT細胞ペプチドエ
 ピトープのヒト免疫原性をアッセイする方法を提供する。

【0025】

1つの局面において、本発明は、2以上の異種ペプチドエピトープをコードする第2のヌクレオチド配列に融合された主要組織適合性遺伝子（MHC）標的化配列をコードする第1のヌクレオチド配列に作動可能に連結されたプロモーターを含む発現ベクター（ここでこの異種ペプチドエピトープは、2つのHTLペプチドエピトープまたはCTLペプチドエピトープおよびユニバーサルHTLペプチドエピトープを含む）を提供する。

【0026】

別の局面において、本発明は、インビボで免疫応答を誘導する方法を提供し、この方法は、哺乳動物の被検体に、2以上の異種ペプチドエピトープをコードする第2のヌクレオチド配列に融合された主要組織適合性遺伝子（MHC）標的化配列をコードする第1のヌクレオチド配列に作動可能に連結されたプロモーターを含む発現ベクターを投与する工程を包含し、ここでこの異種ペプチドエピトープが2つのHTLペプチドエピトープまたはCTLペプチドエピトープおよびユニバーサルHTLペプチドエピトープを含む、工程を包含する。

【0027】

別の局面において、本発明は、インビボで免疫応答を誘導する方法を提供し、この方法は、哺乳動物の被検体に、異種ヒトHTLペプチドエピトープをコードする第2のヌクレオチド配列に融合された主要組織適合性遺伝子（MHC）標的化配列をコードする第1のヌクレオチド配列に作動可能に連結されたプロモーターを含む発現ベクターを投与する工程を包含する。

【0028】

別の局面において、本発明は、非ヒト哺乳動物において、インビボでヒトT細胞ペプチドエピトープのヒト免疫原性をアッセイする方法を提供し、この方法は、非ヒト哺乳動物に、異種ヒトCTLペプチドエピトープまたは異種ヒトHTLペプチドエピトープをコードする第1のヌクレオチド配列に作動可能に連結されたプロモーターを含む発現ベクターを投与する工程を包含する。

【0029】

1つの実施態様において、異種ペプチドエピトープは2以上の異種HTLペプ

チドエピトープを含む。別の実施態様において、異種ペプチドエピトープは、CTLペプチドエピトープおよびユニバーサルHTLペプチドエピトープを含む。別の実施態様において、異種ペプチドエピトープはさらに、2以上の異種CTLペプチドエピトープを含む。別の実施態様において、発現ベクターは、HTLペプチドエピトープおよびCTLペプチドエピトープの両方を含む。

【0030】

1つの実施態様において、1つのHTLペプチドエピトープは、ユニバーサルHTLエピトープである。別の実施態様において、ユニバーサルHTLエピトープは、汎DRエピトープである。別の実施態様において、汎DRエピトープは、配列AlaLysPheValAlaAlaTrpThrLeuLysAlaAlaAla（配列番号38）を有する。

【0031】

1つの実施態様において、ペプチドエピトープは、B型肝炎ウイルスエピトープ、C型肝炎ウイルスエピトープ、ヒト免疫不全ウイルスエピトープ、ヒトパピローマウイルスエピトープ、MAGEエピトープ、PSAエピトープ、PSMエピトープ、PAPエピトープ、p53エピトープ、CEAエピトープ、Her2/neuエピトープ、またはPlasmodiumエピトープである。別の実施態様において、ペプチドエピトープは、それぞれ、表1～8に示されるペプチドからなる群より選択される配列を有する。別の実施態様において、少なくとも1つのペプチドエピトープは、表1～8に示されるペプチドのアナログである。

【0032】

1つの実施態様において、MHC標的化配列は、Iiタンパク質、LAMP-I、HLS-DM、HLA-DO、H2-DO、インフルエンザマトリクスタンパク質、B型肝炎表面抗原、B型肝炎ウイルスcore抗原、Ty粒子、Ig- α タンパク質、Ig- β タンパク質、およびIg κ 鎖シグナル配列からなる群より選択されるポリヌクレオチドの領域を含む。

【0033】

1つの実施態様において、発現ベクターはさらに、1以上の異種HTLペプチドエピトープまたは異種CTLペプチドエピトープをコードする第3のヌクレオ

チド配列に作動可能に連結された第2のプロモーター配列を含む。別の実施態様において、CTLペプチドエピトープは、HLAスーパータイプ (super type) についての構造モチーフを含み、それによってペプチドCTLエピトープは、500 nMよりも大きいアフィニティを有するスーパータイプの2以上のメンバーに結合する。別の実施態様において、CTLペプチドエピトープは、1よりも多いHLA対立遺伝子スーパータイプに対する結合アフィニティを提供する構造モチーフを有する。

【0034】

1つの実施態様において、非ヒト哺乳動物は、ヒトHLA対立遺伝子を発現するトランスジェニックマウスである。別の実施態様において、ヒトHLA対立遺伝子は、A11およびA2.1からなる群より選択される。別の実施態様において、非ヒト哺乳動物は、ヒトHLA対立遺伝子を発現するマカクである。

【0035】

(定義)

「HTL」ペプチドエピトープまたは「MHC II エピトープ」は、MHCクラスII制限エピトープ、すなわち、MHCクラスII分子により結合されるエピトープである。

【0036】

「CTL」ペプチドエピトープまたは「MHC I エピトープ」は、MHCクラスI制限エピトープ、すなわち、MHCクラスI分子により結合されるエピトープである。

【0037】

「MHC標的化配列」とは、細胞質経路（例えば、MHCクラスI抗原プロセッシング経路）、小胞体経路、または嚢胞内膜経路（例えば、MHCクラスII抗原プロセッシング経路）に、例えば、ペプチドエピトープを含むポリペプチドを標的化するペプチド配列をいう。

【0038】

用語「異種」は、核酸の部分を参照して使用される場合、核酸が、本質的に、互いに同じ関係では見出されない2つ以上のサブ配列を含むことを示す。例えば

、新規な機能的核酸を作製するために配置された、非関連遺伝子由来の2つ以上の配列（例えば、ある起源由来のプロモーターおよび別の起源由来のコード領域）を有する核酸が、代表的には、組換え産生される。同様に、異種タンパク質は、タンパク質が、天然には互いに同じ関係では見出されない2つ以上のサブ配列を含むことを示す（例えば、異なるポリペプチド由来のサブ配列、隣接部分に天然には存在しない同じポリペプチド由来のペプチドエピトープ、または単一ペプチドエピトープの反復を含む融合ポリペプチド）。

【0039】

本明細書中で使用される用語「ユニバーサルMHCクラスIIエピトープ」または「ユニバーサルHTLエピトープ」は、複数のMHCクラスII対立遺伝子の遺伝子産物に結合するMHCクラスIIペプチドエピトープをいう。例えば、DR、DP、およびDQ対立遺伝子はヒトMHC II対立遺伝子である。一般に、特有のペプチドセットは、1つのMHCクラスII対立遺伝子の特定の遺伝子産物に結合する。対して、ユニバーサルMHCクラスIIエピトープは、複数のMHCクラスII対立遺伝子の遺伝子産物に結合し得る。ユニバーサルMHCクラスIIエピトープは、2つ以上のMHCクラスII対立遺伝子、一般に3つ以上のMHCクラスII対立遺伝子、そして特に5つ以上のMHCクラスII対立遺伝子に結合する。従って、発現ベクター中のユニバーサルMHCクラスIIエピトープの存在は、それが、ペプチドに結合し得る対立遺伝子MHCクラスII分子の数、および結果として、活性化されるヘルパーTリンパ球の数を増加させるように機能するので、有利である。

【0040】

ユニバーサルMHCクラスIIエピトープは、当該分野で周知であり、そして例えば、「汎DRエピトープ」（「PADRE」とも称する）（Alexanderら、Immunity 1:751-761（1994）；WO95/07707、USSN60/036,713、USSN60/037,432、PCT/US98/01373、09/009,953およびUSSN60/087,192（各々は、本明細書中に参考として援用される））のようなエピトープを包含する。本発明の「汎DR結合エピトープ」または「PADRE」ペプチド

は、少なくとも7つの異なるDR分子、好ましくは12の最も共通するDR分子のうち7つ、最も好ましくは12の最も共通するDR分子（DR1、2w2b、2w2a、3、4w4、4w14、5、7、52a、52b、52c、および53）のうち9つ、または代替的には、ヒト集団の75%以上、好ましくはヒト集団の80%以上を表すDR分子のパネルの50%に結合し得るペプチドである。汎DRエピトープは、多数のDR対立遺伝子に結合し得、そしてT細胞に強く免疫原性である。例えば、汎DRエピトープは、天然MHCクラスIIエピトープよりも、免疫応答の誘発時により有効であることが見出された（Alexander、前出）。PADREエピトープの例は、ペプチドAlaLysPheValAlaAlaAlaTrpThrLeuLysAlaAlaAla（配列番号38）（PADREエピトープのさらなる例については、TTC事件番号018623-006221（1999年5月12日出願、USSN_____、その全体が本明細書中に参考として援用される）の表8を参照のこと）である。

【0041】

特定のアミノ酸配列に関して、「エピトープ」は、特定の免疫グロブリンによる認識に関与するアミノ酸残基のセット、またはT細胞の状況においては、T細胞レセプタータンパク質および／または主要組織適合性複合体（MHC）レセプターによる認識に必要な残基のセットである。免疫系設定において、インビボまたはインビトロで、エピトープは、免疫グロブリン、T細胞レセプター、またはHLA分子により認識される部位を共に形成する分子（例えば、一次、二次、および三次のペプチド構造、および電荷）の集団的特徴である。本開示を通して、エピトープおよびペプチドは、しばしば相互に使用される。しかし、本発明のエピトープよりも大きく、かつこれを含む単離または精製されたタンパク質分子またはペプチド分子もなお、本発明の範囲内に含まれることが理解される。

【0042】

HLAクラスI分子に関して、本明細書中で使用される「高親和性」は、50 nM未満のIC₅₀（またはK_d）での結合として規定される。「中程度の親和性」は、約50～約500 nMの間のIC₅₀（またはK_d）での結合である。HLAクラスII分子への結合に関して「高親和性」は、100 nM未満のK_d

での結合として規定される。「中程度の親和性」は、約100～約1000 nMの間の K_D での結合である。結合を決定するためのアッセイは、例えば、PCT公報WO 94/20127およびWO 94/03205において、詳細に記載される。あるいは、結合は、参照ペプチドに対して発現される。特定のアッセイがより感受性になるか、またはより感受性でなくなるにつれて、試験したペプチドのIC50はいくらか変化し得る。しかし、参照ペプチドに対する結合は、有意に変化しない。例えば、参照ペプチドのIC50は10倍増加するような条件下で実行したアッセイにおいて、試験ペプチドのIC50値はまた、約10倍シフトする。従って、曖昧さを避けるために、ペプチドが良好なバインダーであるか、中程度のバインダーであるか、弱いバインダーであるか、または負のバインダーであるかの評価は、一般に、標準ペプチドのIC50に対するそのIC50に基づく。

【0043】

本開示を通じて、結果は、「IC50」によって表現される。IC50は、参照ペプチドの結合の50%の阻害が観察される、結合アッセイ中のペプチドの濃度である。アッセイが実行される条件を与えると（すなわち、HLAタンパク質の限定および標識化ペプチド濃度）、これらの値は、 K_D 値に近づく。IC50値は、しばしば劇的に（アッセイ条件が変動する場合）、そして使用される特定の試薬（例えば、HLA調製など）に依存して変更し得ることに注意すべきである。例えば、過剰な濃度のHLA分子は、所定のリガンドの見かけ上測定されたIC50を増大させる。

【0044】

用語「同一」または「同一性」%とは、2つ以上のペプチド配列の背景において、比較し、そしてデフォルトプログラムパラメーターを用いる配列比較アルゴリズムを用いて、またはマニュアルアラインメントおよび目視検査によって測定されるように、比較ウィンドウにわたって一致が最大になるように整列した場合、同じであるか、または同じであるアミノ酸残基の特定化された割合を有する2つ以上の配列またはサブ配列をいう。

【0045】

句「単離された」または「生物学的に純粋な」とは、その天然状態で見られるように通常その物質に伴う成分を実質的または本質的に含まない物質をいう。従って、本発明により単離されたペプチドは、好ましくは、インサイチュ環境でペプチドと通常関連する物質を含まない。

【0046】

「主要組織適合性複合体」または「MHC」は、生理的免疫応答を担う細胞性相互作用の制御下で役割を果たす遺伝子のクラスタである。ヒトにおいて、MHC複合体はまた、HLA複合体として公知である。MHCおよびHLA複合体の詳細な説明については、Paul、Fundamental Immunology（第3版、1993）を参照のこと。

【0047】

「ヒト白血球抗原」または「HLA」は、ヒトクラスIまたはクラスII主要組織適合性複合体（MHC）タンパク質である（例えば、Stitesら、Immunology（第8版、1994）を参照のこと）。

【0048】

本明細書中で使用される「HLAスーパータイプまたはファミリー」とは、共有されるペプチド結合特異性に基づいてグループ分けされるHLA分子のセットを記載する。特定のアミノ酸モチーフを有するペプチドについて幾分類似の結合親和性を共有するHLAクラスI分子が、HLAスーパータイプにグループ分けされる。用語HLAスーパーファミリー、HLAスーパータイプファミリー、HLAファミリー、およびHLA xx様スーパータイプ分子（xxは、特定のHLAタイプを示す）は、同義語である。

【0049】

用語「モチーフ」は、特定のHLA分子によって認識される所定の長さのペプチド、通常、クラスI HLAモチーフについて約8～約13アミノ酸、およびクラスII HLAモチーフについて約6～約25アミノ酸のペプチドにおける残基のパターンをいう。ペプチドモチーフは、代表的には、各ヒトHLA対立遺伝子によってコードされる各タンパク質とは異なり、そして第一および第二のアンカー残基のパターンにおいて異なる。

【0050】

「スーパーモチーフ」は、2つ以上のHLA対立遺伝子によってコードされるHLA分子によって共有されるペプチド結合特異性である。従って、好ましくは、2つ以上のHLA抗原による高いまたは中程度の親和性（本明細書中で定義される）を有して認識される。

【0051】

「交差結合」は、ペプチドが1つより多いHLA分子により結合されることを示す；同義語は縮重結合である。

【0052】

用語「ペプチド」は、代表的には、隣接したアミノ酸の α アミノ基とカルボキシル基との間のペプチド結合により一方を他方に連結した一連の残基（代表的には、L-アミノ酸）を示すために、本明細書において「オリゴペプチド」と相互交換して使用される。本発明の好ましいCTL誘導オリゴペプチドは、長さが13残基またはそれより短く、そして通常、約8～約11残基の間、好ましくは9または10の残基からなる。好ましいHTL誘導オリゴペプチドは、長さが約50残基未満であり、そして通常、約6～約30残基の間、より通常には約12～25、そしてしばしば、約15～20の間の残基からなる。

【0053】

「免疫原性ペプチド」または「ペプチドエピトープ」は、そのペプチドがHLA分子に結合し、そしてCTLおよび／またはHTL応答を誘導するような対立遺伝子特異的モチーフまたはスーパーモチーフを含むペプチドをいう。従って、本発明の免疫原性ペプチドは、適切なHLA分子に結合し得、その後、免疫原性ペプチドが由来する抗原に対する細胞傷害性T細胞応答、またはヘルパーT細胞応答を誘導し得る。

【0054】

「防御免疫応答」は、感染因子に由来する抗原または腫瘍抗原に対するCTLおよび／またはHTL応答をいい、これは、疾患症状または進行を予防するか、または少なくとも部分的に阻止する。免疫応答はまた、ヘルパーT細胞の刺激により促進されている抗体応答を含み得る。

【0055】

用語「残基」は、アミド結合またはアミド結合模倣物によりオリゴペプチドに取り込まれ得るアミノ酸またはアミノ酸模倣物をいう。

【0056】

「合成ペプチド」は、天然に存在しないが、化学合成または組換えDNA技術のような方法により合成されるペプチドをいう。

【0057】

ペプチド化合物を記載するために使用される術語は、アミノ基が各アミノ酸残基の左側（N末端）に示され、そしてカルボキシル基が右側（C末端）に示される従来の規則に従う。アミノ酸残基の位置が、ペプチドエピトープ中で言及される場合、それらはアミノからカルボキシルへの方に番号付けられ、1位は、エピトープ、またはそれが一部分であり得るペプチドもしくはタンパク質のアミノ末端に最も近い位置である。本発明の選択された特定の実施態様を表す式において、アミノ末端基およびカルボキシル末端基は、特に示されていないが、他に示されなければ、それらが生理的pH値でとる形態である。アミノ酸構造式において、各残基は、一般に、標準的な三文字表記または一文字表記によって示される。アミノ酸残基のL型は、大文字の一文字表記であるか、または最初の文字が大文字である三文字記号で表され、そしてD型を有するアミノ酸のD型は、小文字の一文字表記または小文字の三文字表記により表される。グリシンは、不斉炭素原子を有さず、単に「Gly」またはGといわれる。

【0058】

本明細書中で使用される用語「発現ベクター」は、適切な標的細胞において目的の抗原（例えば、MHCクラスIまたはクラスIIエピトープ）を発現し得る核酸分子をいうことが意図される。発現ベクターは、例えば、プラスミドまたはウイルス（例えば、DNAもしくはRNAウイルス）であり得る。発現ベクターは、所望の免疫応答を刺激するために、適切な細胞もしくは組織において目的の抗原を発現するこのようなプロモーターエレメントを含む。

【0059】

（発明の詳細な説明）

細胞傷害性Tリンパ球（CTL）およびヘルパーTリンパ球（HTL）は、感染病原性（例えば、ウイルス、細菌、および原生動物）；腫瘍細胞；自己免疫疾患などに対する免疫のために重要である。本発明は、CTLおよび／またはHTL応答を誘導するペプチドエピトープをコードするミニ遺伝子を提供する。本発明のミニ遺伝子はまた、MHC標的化配列を含み得る。異なるエピトープをコードする種々のミニ遺伝子は、HLAトランスジェニックマウスを用いる免疫原性について試験され得る。エピトープは、代表的には、少なくとも2つ以上のHTLエピトープの組み合わせ、またはCTLエピトープ＋ユニバーサルHTLエピトープであり、そして必要に応じてさらなるHTLおよび／またはCTLエピトープを含む。2、3、4、5、6、7、8、9、10、20、30、40、または約50の異なるエピトープ（HTLおよび／またはCTLのいずれか）は、MHC標的化配列と共に、ミニ遺伝子に含まれ得る。エピトープは、異なるHLA制限を有し得る。試験されるべきエピトープは、ウイルス（例えば、HIV、HBV、HCV、HSV、CMV、HPV、およびHTLV）；癌抗原（例えば、p53、Her2/Neu、MAGE、PSA、ヒト乳頭腫ウイルス、およびCEA）；寄生生物（例えば、Trypanosoma、Plasmodium、Leishmania、Giardia、Entamoeba）；自己免疫疾患（例えば、慢性関節リウマチ、重症筋無力症、および紅斑性狼瘡）；真菌（例えば、AspergillusおよびCandida）；細菌（例えば、Escherichia coli、Staphylococci、Chlamydia、Mycobacteria、Streptococci、およびPseudomonas）に由来するエピトープが挙げられる。ミニ遺伝子によりコードされるエピトープは、公開PCT出願WO93/07421、WO94/02353、WO95/010000、WO97/04451、およびWO97/05348（本明細書中に参考として援用される）に記載の方法を用いて選択されそして試験される。

【0060】

（HTLエピトープおよびCTLエピトープ）

本発明の発現ベクターは、1つ以上のMHCクラスIIおよび／またはクラス

I エピトープおよびMHC標的化配列をコードする。発現ベクター中に存在する複数のMHCクラスIIまたはクラスI エピトープは、同じ抗原に由来し得るか、またはMHCエピトープは、異なる抗原に由来し得る。例えば、発現ベクターは、同じウイルスの2つの異なる抗原または異なるウイルスの2つの異なる抗原に由来し得る1つ以上のMHCエピトープを含み得る。さらに、任意のMHCエピトープは、本発明の発現ベクターにおいて使用され得る。例えば、表1～8に示される任意の単一のMHCエピトープまたはMHCエピトープの組み合わせが、本発明の発現ベクターにおいて使用され得る。他のペプチドエピトープは、例えば、HLA対立遺伝子特異的モチーフまたはスーパーモチーフを含むエピトープを選択するためにコンピューターを使用することにより、当業者に選択され得る。本発明の発現ベクターはまた、1つ以上のユニバーサルMHCクラスII エピトープ（例えば、PADRE（例えば、TTC事件番号018623-006221（1999年5月12日出願、US SN_____）の配列番号28および表8を参照のこと）をコードし得る。

【0061】

ユニバーサルMHCクラスII エピトープは、他のMHCクラスI およびクラスII エピトープと有利に組み合わせられて、所定の抗原に応答して活性化される細胞の数を増大させ、そしてMHC反応性対立遺伝子のより広範な集団範囲を提供し得る。従って、本発明の発現ベクターは、抗原に対して特異的なMHCエピトープ、ユニバーサルMHCクラスII エピトープ、または特異的MHCエピトープと少なくとも1つのユニバーサルMHCクラスII エピトープとの組み合わせをコードし得る。

【0062】

MHCクラスI エピトープは、一般に、約5～15アミノ酸長であり、特に約8～11アミノ酸長である。MHCクラスII エピトープは、一般に、約10～25アミノ酸長であり、特に約13～21アミノ酸長である。MHCクラスI またはII エピトープは、目的の任意の所望の抗原に由来し得る。目的の抗原は、ウイルス抗原、表面レセプター、腫瘍抗原、癌遺伝子、酵素、または免疫応答が所望される任意の病原、細胞もしくは分子であり得る。エピトープは、1つまた

は複数のHLA対立遺伝子に結合する能力に基づいて選択され得、そして以下に記載の「アナログ」技術を用いて選択され得る。

【0063】

(標的化配列)

本発明の発現ベクターは、MHC標的化配列に作動可能に連結された1つ以上のMHCエピトープをコードする。MHC標的化配列の使用は、ペプチドエピトープをMHC分子アセンブリおよび細胞表面への輸送の部位に指向させることにより、抗原単独の送達に対して、抗原に対する免疫応答を増強し、それにより、T細胞への結合およびその活性化に利用可能なMHC分子-ペプチドエピトープ複合体の数の増大を提供する。

【0064】

MHCクラスI標的化配列は、本発明において使用される。例えば、MHCクラスIエピトープペプチドは、細胞質経路または小胞体に標的化する配列である(例えば、Rammenseeら、Immunogenetics 41:178-228(1995)を参照のこと)。例えば、細胞質経路は、細胞内で発現される内因性抗原をプロセッシングする。特定の理論に縛られることを望まないが、細胞質タンパク質は、プロテアソームのエンドペプチダーゼ活性により少なくとも部分的に分解され、次いでTAP分子(プロセッシングと関連した輸送体)により小胞体に輸送されると考えられる。小胞体において、抗原は、MHCクラスI分子に結合する。小胞体シグナル配列は、細胞質プロセッシング経路を迂回し、そして小胞体に直接的に内因性抗原を標的化する。ここでペプチドフラグメントへのタンパク質溶解性分解が生じる。このようなMHCクラスI標的化配列は当該分野で周知であり、例えば、シグナル配列(例えば、Ig κ 、組織プラスミノーゲン活性化因子、またはインスリン)を含む。好ましいシグナルペプチドは、ヒトIg κ 鎖配列である。小胞体シグナル配列はまたMHCクラスIIエピトープを小胞体(MHCクラスI分子アセンブリの部位)に標的化するために使用され得る。

【0065】

MHCクラスII標的化配列もまた、本発明において使用され得る。例えば、

ペプチドをエンドサイトーシス経路に標的化するペプチドが挙げられる。これらの標的化配列は、代表的には、エンドサイトーシス経路に侵入するように細胞外抗原を指向し、これによって、抗原がリソソーム区画に移され、ここで、この抗原は、MHCクラスII分子への結合のために抗原ペプチドにタンパク質分解的に切断される。細胞外抗原の通常のプロセッシングと同様に、MHCクラスIIエピトープをエンドサイトーシス経路のエンドソームそして／または続いてリソソーム（ここで、MHCクラスIIエピトープはMHCクラスII分子に結合させ得る）へ指向させる配列は、MHCクラスII標的化配列である。例えば、本発明に有用なMHCクラスII標的化配列のグループは、リソソーム標的化配列である。これは、ポリペプチドをリソソームに局在化させる。MHCクラスII分子は、代表的には、リソソーム中のエンドサイトーシス抗原のタンパク質分解プロセッシングに由来する抗原ペプチドに結合するので、リソソーム標的化配列は、MHCクラスII標的化配列として機能し得る。リソソーム標的化配列は、当該分野で周知であり、そして、Augustら（米国特許第5,633,234号、1997年5月27日公開、本明細書中に参考として援用される）により記載されるようなリソソームタンパク質LAMP-1およびLAMP-2において見出される配列を含む。

【0066】

リソソーム標的化配列を含む他のリソソームタンパク質としては、HLA-DMが挙げられる。HLA-DMは、抗原ペプチドのMHCクラスII分子への結合を容易にする際に機能するエンドソーム／リソソームタンパク質である。それはリソソーム中に局在するので、HLA-DMは、MHCクラスII分子標的化配列として機能し得るリソソーム標的化配列を有する（Copierら、J. Immunol. 157:1017-1027（1996）、これは、本明細書中に参考として援用される）。

【0067】

常在性リソソームタンパク質HLA-DOもまた、リソソーム標的化配列として機能し得る。上記の常在性リソソームタンパク質LAMP-1およびHLA-DM（これらは、タンパク質をリソソームに標的化する特異的なTyr含有モチ

ープをコードする)と対照的に、HLA-DQは、HLA-DMとの会合によりリソソームに対して標的化される(Liljedahlら、EMBO J. 15:4817-4824(1996)、これは、本明細書中に参考として援用される)。従って、HLA-DMとの会合、および結果として、HLA-DQのリソソームへの転移を引き起こすHLA-DQの配列は、MHCクラスII標的化配列として使用され得る。同様に、HLA-DQのマウスホモログ、H2-DQは、MHCクラスII標的化配列を誘導するために使用され得る。MHCクラスIIエピトープは、HLA-DQまたはH2-DQに融合され得、そしてリソソームへ標的化され得る。

【0068】

別の例では、B細胞レセプターサブユニットIg- α およびIg- β の細胞質ドメインが、抗原インターナリゼーションを媒介し、そして抗原提示の効率を増大させる(Bonnerotら、Immunity 3:335-347(1995)、これは、本明細書中に参考として援用される)。従って、Ig- α タンパク質およびIg- β タンパク質の細胞質ドメインは、MHCクラスII分子のプロセッシングおよびそれへの結合のためのエンドサイトーシス経路へMHCクラスIIエピトープを標的化するMHCクラスII標的化配列として機能し得る。

【0069】

MHCクラスIIエピトープをエンドサイトーシス経路に指向させるMHCクラスII標的化配列の別の例は、ポリペプチドを分泌されるように指向させる配列である。ここで、そのポリペプチドはエンドソーム経路に侵入し得る。ポリペプチドを分泌されるように指向させるこれらのMHCクラスII標的化配列は、通常の経路を模倣する。この経路では、外因性の細胞外抗原が、MHCクラスII分子に結合するペプチドにプロセッシングされる。小胞体を通り、そして最終的に分泌されるようにポリペプチドを指向させるように機能する任意のシグナル配列は、分泌されたポリペプチドが、エンドソーム/リソソーム経路に侵入し得、そしてMHCクラスII分子に結合し得るペプチドに切断され得る限り、MHCクラスII標的化配列として機能し得る。このような融合の例は、図11に示される。ここでは、 κ 免疫グロブリンのシグナル配列は、複数のMHCクラスII

エピトープに融合される。

【0070】

別の例では、I i タンパク質は、小胞体においてMHCクラスII分子に結合する。ここで、それは、小胞体に存在するペプチドがMHCクラスII分子に結合するのを防ぐように機能する。従って、MHCクラスIIエピトープのI i タンパク質への融合は、MHCクラスIIエピトープを小胞体およびMHCクラスII分子に標的化する。例えば、I i タンパク質のCLIP配列は、除去されて、そしてMHCクラスIIエピトープが小胞体に指向されるように、MHCクラスIIエピトープ配列で置換され得る。ここでこのエピトープは、MHCクラスII分子に結合する。

【0071】

いくつかの場合では、抗原自体が、MHCクラスIIもしくはIの標的化配列として作用し得、そしてユニバーサルMHCクラスIIエピトープに融合されて、免疫応答を刺激し得る。細胞質ウイルス抗原は、一般にプロセシングされ、そしてMHCクラスI分子との複合体として提示されるが、長期生存細胞質タンパク質（例えば、インフルエンザマトリックスタンパク質）は、MHCクラスII分子プロセシング経路に侵入し得る（GueguenおよびLong, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93:14692-14697 (1996)、これは本明細書中に参考として援用される）。従って、長期生存細胞質タンパク質は、MHCクラスII標的化配列として機能し得る。例えば、ユニバーサルMHCクラスIIエピトープに融合されたインフルエンザマトリックスタンパク質をコードする発現ベクターは、インフルエンザに対する免疫応答を刺激するためにインフルエンザ抗原およびユニバーサルMHCクラスIIエピトープをMHCクラスII経路に標的化するために有利に使用され得る。

【0072】

MHCクラスII標的化配列として機能する抗原の他の例としては、自発的に粒子を形成するポリペプチドが挙げられる。このポリペプチドは、それらを生産する細胞から分泌され、そして自発的に粒子を形成し、これは、エンドサイトーシス（例えば、レセプター媒介エンドサイトーシス）により抗原提示細胞に取り

込まれるか、または食作用により飲み込まれる。この粒子は、エンドソーム／リソソーム経路に侵入した後に抗原ペプチドにタンパク質分解的に切断される。

【0073】

自発的に粒子を形成する1つのこのようなポリペプチドは、HBV表面抗原（HBV-S）である（Diminskyら、*Vaccine* 15:637-647（1997）；Le Borgneら、*Virology* 240:304-315（1998）、その各々は本明細書中に参考として援用される）。粒子を自発的に形成する別のポリペプチドは、HBVコア抗原である（Kuhroberら、*International Immunol.* 9:1203-1212（1997）、これは、本明細書中に参考として援用される）。粒子を自発的に形成するなお別のポリペプチドは、酵母Tyタンパク質である（Weberら、*Vaccine* 13:831-834（1995）、これは、本明細書中に援用される）。例えば、ユニバーサルMHCクラスIIエピトープに融合されるHBV-S抗原を含む発現ベクターは、HBVに対する免疫応答を刺激するためのMHCクラスII経路にHBV-S抗原およびユニバーサルMHCクラスIIエピトープを標的化するために有利に使用され得る。

【0074】

（HLA分子についてのペプチドエピトープの結合親和性）

HLA多型性のかなりの程度が、ワクチン開発へのエピトープを基礎としたアプローチを考慮に入れられる重要な因子である。この因子を特定するために、複数のHLA分子に高親和性または中度親和性で結合し得るペプチドの同定を包含するエピトープの選択が好ましくは利用される。最も好ましくは、これらのエピトープは、2つ以上の対立遺伝子特異的HLA分子に高親和性または中度親和性で結合する。

【0075】

ワクチン組成物のための目的のCTL-誘導ペプチドは、好ましくは500nM未満のクラスI HLA分子に結合親和性を有するペプチドを含む。HTL-誘導ペプチドは、好ましくは1000nM未満のクラスII HLA分子への結合親和性を有するペプチドを含む。例えば、ペプチド結合は、インビトロにおい

て、精製されたHLA分子に結合する候補ペプチドの能力を試験することにより評価される。次いで、高親和性または中度親和性を示すペプチドは、さらなる分析を考慮される。選択されたペプチドは、スーパータイプファミリーの他のメンバーで試験される。好ましい実施態様において、次いで、交差反応性結合を示すペプチドは、ワクチンまたは細胞性スクリーニング分析に用いられる。

【0076】

HLA結合親和性が高いほど、代表的には、より高い免疫原性に関連する。より大きい免疫原性は、いくつかの異なる手段において明白にされ得る。免疫原性は、免疫応答が完全に惹起されるか否かに、および任意の特定の応答の活力に、ならびに応答が惹起される集団の程度に対応する。例えば、ペプチドは集団の多様なアレイにおいて、活発な応答を生じる例ではないが、免疫応答を惹起し得る。これらの原理に従って、高結合ペプチドの90%近くが、中度の親和性で結合するペプチドの約50%と対照的に、免疫原性であることが見出されている。さらに、結合親和性が高いペプチドほど、より活発な免疫原性応答を導く。結果として、高い結合親和性のペプチドが用いられれば、類似の生物学的効果を誘導するために必要なペプチドはより少なくなる。従って、本発明の好ましい実施態様において、高い結合エピトープが特に有用である。

【0077】

HLAクラスI分子についての結合親和性と結合抗原上の別個のペプチドエピトープの免疫原性との間の関連性は、本発明者らにより当該分野で初めて決定された。結合親和性と免疫原性との間の相関は、2つの異なる実験アプローチにおいて分析された(Seftonら、J. Immunol. 153:5586~5592(1994))。最初のアプローチにおいて、HLA結合親和性における10,000倍の範囲にわたる可能性のあるエピトープの免疫原性が、HLA-A*0201トランスジェニックマウスにおいて分析された。第2のアプローチにおいて、約100の異なるB型肝炎ウイルス(HBV)由来の可能性のあるエピトープ(すべてがA*0201結合モチーフを保有する)の抗原性が、急性肝炎患者由来のPBL(末梢血リンパ球)を用いて評価された。これらのアプローチに従い、約500nM(好ましくは50nM以下)の親和性閾値がCTL応答を

惹起するペプチドエピトープの能力を決定することが確認された。これらのデータは、天然に処理されたペプチドおよび合成されたT細胞エピトープについてのクラスI結合親和性測定について真実である。これらのデータはまたT細胞応答の状態における決定基選択の重要な役割を示す（例えば、Schaefferら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86:4649~4653、1989を参照のこと）。

【0078】

HLAクラスII DR分子の場合における免疫原性と関連した親和性閾値がまた、記載されている（例えば、Southwoodら、J. Immunology 160:3363~3373（1998）、およびUS5N60/087192、1998年5月29日出願、を参照のこと）。DR結合親和性の生物学的に有意な閾値を規定するため、それらの制限エレメント（すなわち、モチーフに結合するHLA分子）のための32DR制限エピトープの結合親和性のデータベースが編集された。約半分の場合（32エピトープの15エピトープ）、DR制限は、高い結合親和性に関連した（すなわち、100 nM未満の結合親和性）。他の約半分の場合（32の16）、DR制限は中度の親和性（100~1000 nMの範囲の結合親和性）に関連した。32のうち1つのみの場合は、DR制限は1000 nM以上のIC50と関連した。従ってDR分子の場合、1000 nMが、免疫原性と関連する親和性閾値として規定され得る。

【0079】

（ペプチドエピトープ結合モチーフおよびスーパーモチーフ）

過去数年間、HLAクラスIおよびクラスII分子の大部分が相対的に少ないスーパータイプ（それぞれ、大きく重複するペプチド結合レパートリーおよび主なペプチド結合ポケットのコンセンサス構造により特徴付けられる）に分類され得ることを実証する証拠が蓄積されてきた。

【0080】

HLA分子ポケット分析のため、結晶学的な研究において記載されるようにHLAクラスI分子のBポケットおよびFポケットを含む残基が分析された（Guoら、Nature 360:364（1992）；Saperら、J. Mol

. Biol. 219:277 (1991); Maddenら、Cell 75:693 (1993); Parhamら、Immunol. Rev. 143:141 (1995))。これらの分析において、残基9、45、63、66、67、70および99は、Bポケットを作成すると考えられた；そしてBポケットはペプチドリガンドの第2の部位におけるアミノ酸残基について特異性を決定すると思われた。同様に、残基77、80、81および116は、Fポケットの特異性を決定すると考えられた；このFポケットは、HLAクラスI分子によるペプチドリガンド結合のC末端残基について特異性を決定すると考えられた。

【0081】

単一アミノ酸置換された抗原アナログの研究、および内在性に結合した、天然に処理されたペプチドの配列決定を通じて、HLA分子への対立遺伝子特異的結合に必要な、重要な残基が同定された。これらの残基の存在は、HLA分子についての結合親和性と関連する。高親和性結合および中度親和性結合と関連するモチーフおよび／またはスーパーモチーフの同定は、ワクチンへの封入のための免疫原性ペプチドエピトープの同定に関しては重要な問題である。Kastら(J. Immunol. 152:3904~3912 (1994))は、モチーフ保有ペプチドが、対立遺伝子特異的HLAクラスI分子に結合するエピトープの90%の割合を占めることを示した。この研究において、すべての可能性のある9アミノ酸長のペプチドおよび8アミノ酸重複するペプチド(240ペプチド)(ヒトパピローマウイルス16型のE6およびE7タンパク質の全体配列をカバーする)は、異なる人種群間で高い頻度で発現される5つの対立遺伝子特異的HLA分子への結合を評価された。ペプチドのこの偏りのないセットは、HLAクラスIモチーフの予想値の評価を可能にした。240ペプチドのセットから、高親和性および中度の親和性で対立遺伝子特異的HLA分子に結合する22のペプチドが同定された。これらの22ペプチドの20(すなわち、91%)がモチーフ保有であった。従って、この研究は、ワクチンへの封入のためのペプチドエピトープの同定のためのモチーフの値を示す：モチーフを基礎とした同定技術の適用は、標的抗原タンパク質配列において可能性のあるエピトープの90%のスクリーニングを排除する。

【0082】

本発明のペプチドはまた、MHCクラスII DR分子に結合するエピトープを含み得る。クラスIとクラスIIHLA分子との間に有意な差異が存在する。この差異は、結合ポケットに関係するストリンジェントなサイズ制限およびモチーフ位置がクラスI分子に結合するペプチドに存在するが、ペプチドのN末端およびC末端に関係する、モチーフのサイズおよび結合フレーム位置の両方におけるより大きい程度の異種性が、クラスIIペプチドリガンドに存在するという事実に対応する。

【0083】

HLAクラスIIペプチドリガンドのこの増大した異種性は、HLAクラスII分子の結合グループの構造（そのクラスI対応物が両端で開かれるのと異なる）に起因する。HLAクラスII DRB*0101-ペプチド複合体の結晶学的な分析は、DRB*0101と複合体化されたペプチドの位置1および位置6を占める残基が、最も重要なアンカー残基および最も深い疎水性ポケットに対応するP1位置で、DRBa*0101分子上の2つの相補ポケットを使用することを示した（例えば、Madden, Ann. Rev. Immunol. 13: 587 (1995)を参照のこと）。他の研究はまた、種々の他のDR分子に結合するための重要なアンカー残基としてP6位置を示した。

【0084】

従って、本発明のペプチドは、任意のいくつかのHLAクラスIまたはクラスII特異的のアミノ酸モチーフの1つにより同定される（例えば、その全体が参考として本明細書中に援用される、米国特許出願09/226,775号および09/239,043号の表I~IIIを参照のこと）。いくつかの対立遺伝子特異的HLA抗原に結合する能力に対応するモチーフが存在する場合、それはスーパーモチーフといわれる。特定のアミノ酸スーパーモチーフを有するペプチドに結合する対立遺伝子特異的HLA分子は、総称してHLA「スーパータイプ」といわれる。

【0085】

（免疫応答刺激ペプチドアナログ）

一般に、CTL応答およびHTL応答は、全ての可能性のあるエピトープに対して指向されない。どちらかといえば、CTLおよびHTL応答は、わずかな「イムノドミナントな」決定基に制限される（Zinkernagelら、Adv. Immunol. 27:5159（1979）；Benninkら、J. Exp. Med. 168:1935～1939（1988）；Rawleら、J. Immunol. 146:3977～3984（1991））。イムノドミナンス（immunodominance）（Benacerrafら、Science 175:273～279（1972））は、特定のHLAタンパク質に選択的に結合する所定のエピトープの能力（決定基選択理論）（Vitellioら、J. Immunol. 131:1635（1983））；Rosenthalら、Nature 267:156～158（1977）または存在するTCR（T細胞レセプター）特異性により選択的に認識されること（レパートリー理論）（Klein, Immunology, The Science of Self of self Discrimination、270～310頁（1982））のいずれかにより説明され得ることが認識されている。さらなる因子（大部分は処理化事象に連結される）はまた、厳密な免疫原性を超える命令において重要な役割（多数の可能性のある決定基がイムノドミナントとして示される）を果たし得ることが実証されている（Sercarzら、Annu. Rev. Immunol. 11:729～766（1993））。

【0086】

ドミナンスおよびサブドミナンスの概念は、感染性疾患および癌の両方の免疫療法に関する。例えば、慢性ウイルス疾患の経過において、サブドミナントなエピトープの補充は、特に優性なCTLまたはHTLの特異性が機能的な耐性、抑制、ウイルスの変異および他の機構により不活性化された場合、感染の首尾良い排除に重要であり得る（Francoら、Curr. Opin. Immunol. 7:524～531（1995））。癌抗原および腫瘍抗原の場合、少なくともいくつかの最高結合親和性のペプチドを認識するCTLは、機能的に不活性化され得る。より低い結合親和性のペプチドは、これらの時点で優先的に認識され、従って治療的または予防的な抗癌ワクチンにおいて好ましくあり得る。

【0087】

特に、公知の非ウイルス腫瘍関連抗原（TAA）由来の多数のエピトープが中度の親和性（50～500 nMの範囲のIC50）でHLAクラスIに結合することが知られている。例えば、腫瘍浸潤リンパ球（TIL）またはCTLにより認識された公知のTAAペプチドの15のうちの8つが50～500 nMの範囲で結合したことが見出されている。（これらのデータは、公知のウイルス抗原の90%が50 nM以下のIC50でHLAクラスI分子により結合され、一方わずか約10%が50～500 nMの範囲で結合したという概算とは対照的である（Setteら、J. Immunol. 153:558～5592（1994））。癌の状況において、この現象は、おそらく最高の結合ペプチドのいくつかを認識するCTLの排除または機能的阻害（おそらくT細胞寛容化事象による）に起因する。

【0088】

理論により束縛されることを意図しないが、ドミナントなエピトープに対してT細胞がクローン的に除去され得たので、サブドミナントなエピトープを選択することは、現存のT細胞が補充されることを可能にし得、次いでこれは治療的応答または予防的応答を導くと考えられる。しかし、サブドミナントなエピトープへのHLA分子の結合はしばしば、ドミナントなエピトープへの結合よりも強力でない。従って、例えば、より強力な応答を惹起するアナログペプチドを調製するため、1つ以上のHLA分子についての特定の免疫原性エピトープの結合親和性を調節し、これによりペプチドにより惹起された免疫応答を調節し得ることの必要性が存在する。この能力は、ペプチドを基礎とするワクチンおよび治療剤の有用性を大きく増強する。

【0089】

従って、スーパーファミリーのすべての対立遺伝子の中で適切な交差反応性を有するペプチドは、上記のスクリーニング手順により同定されるが、交差反応性は、常に可能なほど完全ではなく、そして特定の場合、ペプチドの交差反応性をさらに増大するための手順が有用であり得る；さらにこのような手順はまた、結合親和性またはペプチド安定性のようなペプチドの他の特性を改変するために用

いられ得る。所定のモチーフまたはスーパーモチーフ内のHLA対立遺伝子についてペプチドの交差反応性を管理する一般的な規則を樹立して、より広い（さなければ改変された）HLA結合能力を獲得するために特定の目的のペプチドの構造の改変（すなわち、アナログ化）が実行され得る。より詳細には、最も広い交差反応性パターンを示すペプチドが、本明細書における教示に従って作製され得る。アナログ生成に関する現在の概念は、同時係続の米国特許出願09/226,775により詳細に記載される。

【0090】

手短には、使用された戦略は、特定のHLAクラスIおよびクラスIIの分子への結合に関するモチーフまたはスーパーモチーフを利用する。このモチーフまたはスーパーモチーフは、一次アンカー、および多くの場合二次アンカーを有することにより規定される（米国特許出願第09/226,775号の表I～IIIを参照のこと）。アナログペプチドは、一次アンカー、二次アンカーまたは一次アンカー位置および二次アンカー位置でのアミノ酸残基の置換により作製され得る。一般的に、アナログはすでにモチーフまたはスーパーモチーフを保有するペプチドについて作製される。HLAクラスIおよびクラスIIの結合ペプチドについて規定されたスーパーモチーフおよびモチーフの好ましい二次アンカー残基が、それぞれ米国特許出願第09/226,775号の表IIおよびIIIに示される。

【0091】

本発明に従う多数のモチーフまたはスーパーモチーフについて、それぞれのモチーフまたはスーパーモチーフに結合する対立遺伝子特異的なHLA分子またはHLAスーパータイプのメンバーへの結合に有害な残基が規定される（米国特許出願第09/226,775号の表IIおよびIIIを参照のこと）。従って、結合に有害なこのような残基の除去は、本明細書において記載される方法に従って実行され得る。例えば、A3スーパータイプの場合、このような有害な残基を有するすべてのペプチドが、分析されたペプチドの集団から除去されるとき、交差反応性の頻度は22%から37%へ増加する（I., Sidneyら, Hu. Immunol. 45:79 (1996)）。従って、所定のスーパーモチーフ

内でペプチドの交差反応性を改善するための1つの戦略は、単に、ペプチド内に存在する有害な1つ以上の残基を欠失すること、およびA1aのような小さい「中性の」残基（ペプチドのT細胞認識に影響し得ない）を置換することである。ペプチド内の決定残基の排除と一緒に、対立遺伝子特異的HLA分子またはスーパーファミリー内の複数のHLA分子に対する高親和性結合に関連する「好ましい」残基が挿入される場合、交差反応性の見こみの増強が期待される。

【0092】

ワクチンとして用いた場合、アナログペプチドが、インビボにおいて、天然のエピトープに対してCTL応答を実際に惹起すること（または、クラスIIエピトープの場合、野生型ペプチドと交差反応するヘルパーT細胞を惹起しないこと）を保証するため、このアナログペプチドは、適切なHLA対立遺伝子の個体からインビトロでT細胞を免疫するために用いられ得る。その後、野生型ペプチドを感作した標的細胞の溶解を誘導する免疫細胞の能力が評価される。クラスIおよびクラスIIの両方の系において、内因的に産生された抗原がまた関連するT細胞により認識されるか否かを確認するために、適切な遺伝子で感染されるかまたはトランスフェクトされるかのいずれかをされた細胞を、標的として使用することが望ましい。

【0093】

本発明の別の実施態様は、それによって交差反応性の細胞接着因子の適切な数を確認するために、弱い結合ペプチドのアナログを作製することである。500～50000nMの結合親和性を表し、そして1つまたは両方の位置で受容可能だが最適未満の一次アンカー残基を保有するクラスIペプチドは、それぞれのスーパータイプに従って好ましいアンカー残基の置換により「固定」され得る。次いで、アナログペプチドは、交差結合活性について試験され得る。

【0094】

効果的なペプチドアナログを作製するための別の実施態様は、たとえば、液体環境中のペプチド安定性または溶解性に有害な影響を有する残基の置換を含む。この置換は、ペプチドエピトープの任意の位置で生じ得る。例えば、システイン（C）は、 γ アミノ酪酸の方を選んで置換され得る。その化学特性に起因して、

システインはジスルフィド架橋を形成する傾向を有し、そしてペプチドを構造的に十分変化し、結合能力を低下する。Cについての γ アミノ酪酸置換は、この問題を緩和するだけでなく、特定の例において結合能力および架橋能力を実際に改善する (Setteら、Persistent Viral Infections (AhmedおよびChen編、1998))。 γ アミノ酪酸でのシステインの置換は、ペプチドエピトープの任意の残基、すなわちアンカー位置または非アンカー位置のいずれでも生じ得る。

【0095】

(発現ベクターおよびミニ遺伝子の構築)

本発明の発現ベクターは、抗原が発現され、そして適切なMHC分子に標的化されるように、生物体の適切な細胞において、目的の抗原 (例えば、MHCクラスIエピトープまたはMHCクラスIIエピトープ) およびMHC標的化配列をコードする転写単位を発現し得る少なくとも1つのプロモーターエレメントを含む。例えば、発現ベクターがヒトのような哺乳動物に投与される場合、ヒト細胞内で機能するプロモーターエレメントが、発現ベクターに組み込まれる。本明細書において記載されるMHCクラスII標的化配列に融合したMHCクラスIIエピトープおよびMHCクラスIエピトープを発現するのに有用な発現ベクターの例は、実施例IVに記載されるpEP2ベクターである。

【0096】

本発明は、組換え遺伝子の分野における慣用的な技術に依存する。本発明における使用の一般的方法を開示する基礎的なテキストには以下が挙げられる: Sambrookら、Molecular Cloning, A Laboratory Manual (第2版、1989); Kriegler, Gene Transfer and Expression: A Laboratory Manual (1990); および Current Protocols in Molecular Biology (Ausubelら、編、1994); Oligonucleotide Synthesis: A Practical Approach (Gait編、1984); Kuipers, Nucleic Acids Research 18 (17): 5197 (1994);

Dueholm, J. Org. Chem. 59:5767~5773 (1994); Methods in Molecular Biology, 第20巻 (Agrawal編); ならびに Tijssen, Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology-Hybridization with Nucleic Acid Probes、例えば、第1部、第2章「Overview of principles of hybridization and the strategy of nucleic acid probe assays」(1993))。

【0097】

このミニ遺伝子は、2つまたは多数の異なるエピトープ（例えば、表1～8を参照のこと）から構成される。このエピトープをコードする核酸は、標準技術に従いミニ遺伝子にアセンブルされる。一般に、ミニ遺伝子エピトープをコードする核酸配列は、オリゴヌクレオチドプライマーを用いる増幅技術を用いて単離されるか、または化学的に合成される。組換えクローニング技術がまた、適切な場合に用いられ得る。所望のエピトープを増幅する（ミニ遺伝子にアセンブルするためにPCRを用いる場合）か、またはコードする（ミニ遺伝子にアセンブルするために合成オリゴヌクレオチドを使用する場合）かのいずれかのオリゴヌクレオチド配列が選択される。

【0098】

プライマーを用いる増幅技術は、代表的にDNAまたはRNAから選んだエピトープをコードする配列を増幅および単離するために用いられる（米国特許第4,683,195号および同第4,683,202号; PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications (Innisら、編、1990)を参照のこと）。ポリメラーゼ連鎖反応（PCR）およびリガーゼ連鎖反応（LCR）のような方法が、直接、mRNA、cDNA、ゲノムライブラリーまたはcDNAライブラリーから、エピトープの核酸配列を増幅するために用いられ得る。制限エンドヌクレアーゼ部位は、プライマーに組み込まれ得る。PCR反応により増幅されるミニ遺伝子は、アガロー

スゲルから精製され得、そして適切なベクターにクローニングされ得る。

【0099】

合成的オリゴヌクレオチドはまた、ミニ遺伝子を構築するために用いられ得る。この方法は、遺伝子のセンス鎖および非センス鎖の両方を示す、一連の重複するオリゴヌクレオチドを用いて実行され得る。次いでこれらのDNAフラグメントはアニーリングされ、連結され、そしてクローニングされる。市販されていないオリゴヌクレオチドは、Van Devanterら、Nucleic Acids Res. 12:6159~6168 (1984)に記載の自動合成機を用いて、BeaucageおよびCaruthers, Tetrahedron Letts. 22:1859~1862 (1981)に最初に記載された固相ホスホルアミダイトトリエステル法に従って、化学的に合成され得る。オリゴヌクレオチドの精製は、ネイティブアクリルアミドゲル電気泳動、または陰イオン交換HPLC (PearsonおよびReanier, J. Chrom. 255:137~149 (1983)に記載されるように)のいずれかによる。

【0100】

ミニ遺伝子のエピトープは、代表的に、直接転写のための強力なプロモーターならびにエンハンサーおよびポリアデニル化部位のような他の調節配列を含む発現ベクターにサブクローニングされる。適切なプロモーターは、当該分野で周知であり、そして例えば、SambrookらおよびAusubelらに記載される。哺乳動物細胞のための真核生物発現系は、当該分野で周知であり、そして市販されている。このようなプロモーターエレメントとしては、例えば、サイトメガロウイルス (CMV)、ラウス肉腫ウイルスLTRおよびSV40が挙げられる。

【0101】

発現ベクターは、代表的に、宿主細胞におけるミニ遺伝子の発現に必要な全てのさらなるエレメントを含む転写単位または発現カセットを含む。従って、代表的な発現カセットは、ミニ遺伝子に作動可能に連結されたプロモーターおよび転写の有効なポリアデニル化に必要なシグナルを含む。このカセットのさらなるエレメントは、機能的なスプライスドナーおよびアクセプター部位を有するエンハ

ンサーおよびイントロンを含み得る。

【0102】

プロモーター配列に加えて、発現カセットはまた、効率的な終止を提供するための構造遺伝子の下流の転写終止領域を含み得る。終止領域は、プロモーター配列と同じ遺伝子から得られても良いし、または異なる遺伝子から得られても良い。

【0103】

細胞への遺伝情報を輸送するために用いられる特定の発現ベクターは、特に重要ではない。真核生物細胞における発現のために用いられる任意の従来のベクターがまた用いられ得る。真核生物ウイルス由来の調節エレメントを含む発現ベクターは、代表的に真核生物の発現ベクター、例えば、SV40ベクター、パピローマウイルスベクター、およびエプスタインバーウイルス由来のベクターにおいて用いられる。他の例示的な真核生物ベクターとしては以下が挙げられる：pMSG、pAV009/A+、pMTO10/A+、pMAMneo-5、パキキュロウイルスpDSVE、およびSV40初期プロモーター、SV40後期プロモーター、メタロチオネインプロモーター、マウス乳腺癌ウイルスプロモーター、ラウス肉腫ウイルスプロモーター、ポリヘドリンプロモーター、または真核生物細胞における発現のために有効性を示す他のプロモーターの指示下で、タンパク質の発現を可能にする任意の他のベクター。1つの実施態様において、このベクターpEP2が、本発明において用いられる。

【0104】

代表的に発現ベクターに含まれる他のエレメントはまた、E. coliにおいて機能するレプリコン、組換えプラスミドを保有する細菌の選択を可能にする抗生物質耐性をコードする遺伝子、および真核生物配列の挿入を可能にするプラスミドの非必須領域における特有の制限部位を含む。選択される特定の抗生物質耐性遺伝子は、重要でなく、当該分野で公知の任意の多数の耐性遺伝子が適切である。原核生物配列は、必要であれば、好ましくは、それらが真核生物細胞におけるDNAの複製を妨害しないように選択される。

【0105】

(インビボ投与)

本発明はまた、本発明の発現ベクターを個体に投与することにより免疫応答を刺激するための方法を提供する。免疫応答を刺激するための本発明の発現ベクターの投与は、利点がある。なぜなら、本発明の発現ベクターは、MHC分子に対してMHCエピトープを標的し、従って発現ベクターによりコードされる抗原により活性化されるCTLおよびHTLの数を増加させるからである。

【0106】

最初に、本発明の発現ベクターは、所望の免疫応答を刺激する際に至適活性を有する発現ベクターを決定するためにマウスにおいてスクリーニングされる。従って最初の研究は、MHC標的化配列のマウス遺伝子を用いて可能な場所で実行される。本発明の発現ベクターの活性を決定する方法は、当該分野で周知であり、そして例えば、以下の実施例IIおよびIIIに記載されるように、T細胞活性を測定するための³Hチミジンの取り込み、およびCTL活性を測定するための⁵¹Crの放出を含む。実施例IVに記載の実験と類似の実験が免疫応答を刺激する活性を有する発現ベクターを決定するために実行される。活性を有する発現ベクターはさらにヒトにおいて試験される。コードされたマウス配列に対する有害な免疫学的応答の可能性を回避するため、活性を有する発現ベクターは、MHCクラスII標的配列がヒト遺伝子に由来するように改変される。例えば、種々のMHCクラスII標的化配列を含む遺伝子のヒト相同体のアナログ領域の置換は、本発明の発現ベクターに置換される。MHCクラスII標的化配列を含む遺伝子のこのようなヒト相同体の例は、図12～17に示される。ヒトMHCクラスII標的化配列を含む発現ベクター（例えば、以下、実施例Iに記載されるベクター）は、ヒトにおいて免疫応答を刺激する活性について試験される。

【0107】

本発明はまた、薬学的に受容可能なキャリアおよび本発明の発現ベクターを含む薬学的組成物に関する。薬学的に受容可能なキャリアは、当該分野で周知であり、そして以下を含む：水溶液もしくは非水溶液、懸濁液、および乳濁液（生理学的に緩衝化された生理食塩水、アルコール溶液／水性溶液または他の溶剤もしくはビヒクル（例えば、グリコール、グリセロール、オリーブ油のような油、ま

たは注射可能な有機エステル)を含む)。

【0108】

薬学的に受容可能なキャリアは、例えば、発現ベクターを安定化するためか、または発現ベクターの吸収を増加するために作用する生理学的に受容可能な化合物を含み得る。このような生理学的に受容可能な化合物は、例えば、グルコース、スクロースまたはデキストランのような炭水化物、アスコルビン酸またはグルタチオンのような抗酸化剤、キレート剤、低分子量ポリペプチド、抗微生物剤、不活性ガスもしくはその他の安定化剤または賦形剤を含む。さらに、発現ベクターは、ペプチド、ポリペプチドおよび炭水化物のようなその他の成分と複合体化され得る。発現ベクターはまた、例えば、ワクチン鋳を用いて、個体に投与され得る粒子またはビーズに複合体化され得る。当業者は、例えば、発現ベクターの投与の経路に依存して、生理学的に受容可能な化合物を含む、薬学的に受容可能なキャリアの選択を知っている。

【0109】

本発明は、さらに、免疫応答を刺激するために本発明の発現ベクターを含む薬学的組成物を投与する方法に関する。この発現ベクターは、それぞれが参考として本明細書に援用される、Donnellyら(Ann. Rev. Immunol. 15:617~648(1997))；Felgnerら(米国特許第5,580,859号、1996年12月3日発行)；Felgner(米国特許第5,703,055号、1997年12月30日発行)；およびCarsonら(米国特許第5,679,647号、1997年10月21日発行)に記載のように、当該分野で周知の方法により投与される。1つの実施態様では、ミニ遺伝子が裸の核酸として投与される。

【0110】

本発明の発現ベクターを含む薬学的組成物は、例えば、それぞれ、経口、経膈、経直腸、または静脈内、筋肉内、皮下、眼窩内、嚢内、腹腔内、槽内のような非経口的に、または例えば皮膚パッチもしくは経皮イオン浸透療法を用いる皮膚を通じる受動もしくは促進吸収によることを含む、種々の経路により、被験体中の免疫応答を刺激するために投与され得る。さらに、この組成物は、注射、挿管

または局所的に投与され得、後者は、例えば、軟膏もしくは粉末の直接付与による受動的であり得るか、または、例えば、鼻スプレーまたは吸入薬を用いて能動的であり得る。発現ベクターはまた、局所スプレーとして投与され得、この場合には、この組成物の1つの成分は、適切な噴霧剤である。この薬学的組成物はまた、所望であれば、リポソーム、ミクロスフェアまたはその他のポリマーマトリックス（各々が参考として本明細書に援用される、F e l g n e r ら、米国特許第5, 703, 055号；G r e g o r i a d i s, L i p o s o m e T e c h n o l o g y、第I～III巻（第2版、1993））中に取り込まれ得る。例えば、リン脂質またはその他の脂質からなるリポソームは、作製および投与することが比較的単純である、非毒性、生理学的に受容可能および代謝可能なキャリアである。

【0111】

本発明の発現ベクターは、動物身体の組織の間隙空間に送達され得る（F e l g n e r ら、米国特許第5, 580, 859号および同第5, 703, 055号）。本発明の発現ベクターの筋肉への投与は、皮内および皮下注射ならびに経皮投与を含み、投与の特に効果的な方法である。イオン浸透療法によるような経皮投与はまた、本発明の発現ベクターを筋肉に送達するための効果的な方法である。本発明の発現ベクターの表皮投与もまた採用され得る。表皮投与は、刺激原に対する免疫応答を刺激するために、表皮の最外層を機械的もしくは化学的に刺激することを含む（C a r s o n ら、米国特許第5, 679, 647号）。

【0112】

免疫応答を刺激するために、本発明の発現ベクターを投与するその他の効果的な方法は粘膜投与を含む（C a r s o n ら、米国特許第5, 679, 647号）。粘膜投与のために、投与の最も効果的な方法は、発現ベクターおよび薬学的組成物を含む適切なエアロゾルの鼻内投与を含む。坐剤および局所調製物もまた、生殖器、膣および眼部位の粘膜組織への発現ベクターの送達のために効果的である。さらに、発現ベクターは、粒子に複合体化されそしてワクチン銃により投与され得る。

【0113】

投与されるべき用量は投与の方法に依存し、そして一般に、約 $0.1\mu\text{g}$ ～約 $200\mu\text{g}$ の間である。例えば、用量は、約 $0.05\mu\text{g}/\text{kg}$ ～約 $50\text{mg}/\text{kg}$ 、特に約 $0.005\sim 5\text{mg}/\text{kg}$ であり得る。例えば、効果的な用量は、発現ベクターの投与後、免疫応答を測定することにより決定され得る。例えば、発現ベクターによりコードされるMHCクラスIIエピトープまたはMHCクラスIIエピトープに特異的な抗体の産生が、ELISAまたはその他の免疫学的アッセイを含む、当該分野で周知の方法により測定され得る。さらに、Tヘルパー細胞またはCTL応答の活性化が、当該分野で周知の方法により測定され得、例えば、T細胞活性化を測定するための ^3H チミジンの摂取およびCTL活性を測定するための ^{51}Cr の放出を含む（以下の実施例IIおよびIIIを参照のこと）。

【0114】

本発明の発現ベクターを含む薬学的組成物は、予防または治療目的のために、哺乳動物、特にヒトに投与され得る。本発明の発現ベクターを用いて処置または予防され得る疾患の例は、HBV、HCV、HIVおよびCMVでの感染、ならびに前立腺癌、腎臓癌、頸部癌、リンパ腫、尖圭コンジロームおよび後天性免疫不全症候群（AIDS）を含む。

【0115】

治療の適用では、本発明の発現ベクターは、すでに、癌、自己免疫疾患を患うかまたはウイルスで感染した個体に投与される。疾患の潜伏期または急性期の個体が、すべてのユニバーサルMHCクラスIIエピトープを発現するベクターを含む本発明の発現ベクターで、必要に応じて、他の処置とは別にかまたそれと組み合わせて処置され得る。

【0116】

治療および予防適用には、本発明の発現ベクターを含む薬学的組成物は、抗原に対する効果的な免疫応答を惹起し、かつ疾患の徴候または症状を改善するに十分な量で患者に投与される。疾患の徴候または症状を改善するに十分である、投与するための発現ベクターの量は、治療的に有効な用量と呼ばれる。治療的に有効な用量を達成するに十分な発現ベクターの量は、本発明の発現ベクターを含む

薬学的組成物、投与の様式、処置される疾患の状態および重篤度、患者の体重および健康の一般状態、ならびに担当医の診断に依存する。

【0117】

本明細書に引用されるすべての刊行物および特許出願は、あたかも、各々個々の刊行物または特許出願が、詳細にかつ個々に参照によって援用されて示されるように、本明細書に参考として援用される。

【0118】

前述の発明は、理解を明瞭にする目的で、説明および例によりある程度詳細に記載しているが、本発明の教示を考慮して、添付の請求項の思想および範囲を逸脱することなく、特定の変更および改変がそれになされ得ることは当業者に容易に明らかである。

【0119】

(実施例)

以下の実施例は、例示のみの目的で提供され、そして限定するものではない。当業者は、本質的に類似の結果を生じるように変更または改変され得る、種々の重要でないパラメーターを容易に認識する。

【0120】

(実施例 I : MHC クラス II エピトープを含む発現ベクターの構築)

この実施例は、抗原が、MHC クラス II 分子を標的にするために用いられ得る MHC クラス II エピトープを含む、発現ベクターの構築を示す。

【0121】

DNA 構築物を含む発現ベクターは、重複するオリゴヌクレオチド、ポリメラーゼ連鎖反応 (PCR) および標準的な分子生物学の技法 (各々が本明細書に参考として援用される、Dieffenbach & Dveksler, PCR Primer: A Laboratory Manual (1995); Sambrook ら, Molecular Cloning: A Laboratory Manual (第2版, 1989)) を用いて調製された。

【0122】

完全長の野生型 I i を生成するために、完全長の不変異体鎖を増幅し、クロー

ン化し、および配列決定し、そして3つの不変異体鎖構築物の構築に用いた。注記した場所を除いて、以下に列挙されたすべての構築物のcDNAの供給源は、Balb/c雄から作製されたMouse Spleen Marathon-Ready cDNAであった(Clontech; Palo Alto CA)。プライマー対は、オリゴヌクレオチドGCTAGCGCCGCCACCATGGATGACCAACGCGACCTC(配列番号40)、これは、murIi-Fと称され、そしてNheI部位、次いでコンセンサスKozak配列およびIi cDNAの5'末端を含む；およびオリゴヌクレオチドGGTACCTCACAGGGTGACTTGACCCAG(配列番号41)、これは、murIi-Rと称され、そしてKpnI部位およびIiコード配列の3'末端を含む、であった。

【0123】

PCR反応には、5 μ lの脾臓cDNAおよび250 nMの各プライマーを、各0.25 mMの各dNTP、および10 mMのKCl、10 mMの(NH₄)₂SO₄、20 mMのTris-クロライド、pH 8.75、2 mMのMgSO₄、0.1%のTRITON X-100および100 μ g/mlのウシ血清アルブミン(BSA)を含むPfuポリメラーゼ緩衝液中の2.5単位のPfuポリメラーゼをとまう100 μ l反応中で組み合わせた。Perkin/Elmer 9600 PCRマシン(Perkin Elmer; Foster City CA)を用い、そしてサイクリング条件は：95℃の1サイクル5分間、次いで95℃15秒間、52℃30秒間、および72℃1分間の30サイクルであった。このPCR反応物を、1%アガロースゲル上で泳動し、そして670塩基対の産物を切断し、Millipore Ultrafree-MCフィルター(Millipore; Bedford MA)によりスピンすることにより精製し、そしてInvitrogen(San Diego, CA)からのpCR-BLUNT中にクローン化した。個々のクローンを、配列決定によりスクリーニングし、そして正確なクローン(bIi#3と命名)を、ヘルパー構築物のテンプレートとして用いた。

【0124】

I i タンパク質由来のすべての (p a n) D R エピトープ配列および M H C I I 標的配列を含む D N A 構築物を調製した。この I i マウスタンパク質は、先に記載されており (Z h u & J o n e s, N u c l e i c A c i d s R e s. 17:447~448 (1989))、これは参考として本明細書に援用される。簡単に記載すると、I i P A D R E 構築物は、C L I P 領域を正確に置換する P A D R E をもつ完全長 I i 配列を含む。この D N A 構築物は、不変異体鎖の 1~87 のアミノ酸をコードし、次いで 13 アミノ酸の P A D R E 配列 (配列番号 38) および不変異体鎖 D N A 配列の残り (アミノ酸 101~215) が続く。この構築物を、連結されて最終構築物を生成した、2つの重複する半分で増幅した。5' 半分を増幅するために用いた 2つのプライマーは、m u r I i -F、および I i P A D R E -R と称されるオリゴヌクレオチド C A G G G T C C A G G C A G C C A C G A A C T T G G C C A C A G G T T T G G C A G A (配列番号 42) である。この I i P A D R E -R プライマーは、I i P A D E R のヌクレオチド 303~262 を含む。3' 半分は、I i P A D R E -F と称され、そして I i P A D R E のヌクレオチド 288~330 を含む、プライマー G G C T G C C T G G A C C C T G A A G G C T G C C G C T A T G T C C A T G G A T A A C (配列番号 43) ; および m u r I i -R で増幅した。P C R 条件は上記と同じであり、そして 2つの半分を、上記のようにアガロースゲル電気泳動により単離した。

【0125】

10 μ l の各 P C R 産物を、5 サイクルについて 50 $^{\circ}$ C のアニーリング温度で 100 μ l P C R 反応中で組み合わせ、完全長テンプレートを生じた。プライマーの m u r I i -F および m u r I i -R を添加し、そして 25 のさらなるサイクルを実施した。完全長の I i P A D R E 産物を単離し、クローン化し、そして上記のように配列決定した。この構築物は、I i の C L I P 配列を置換する汎 D R エピトープ配列をもつマウス I i 遺伝子を含む (図 1)。

【0126】

一連の複数 M H C クラス I I エピトープに融合した、I i の細胞質ドメイン、膜貫通ドメインおよび管腔ドメインの一部を含む、I 80 T と称する D N A 構築

物を構築した(図2)。簡単に記載すると、一連の複数MHCクラスIIエピートープを、3つの重複するオリゴヌクレオチド(オリゴ)を用いて構築した。各オリゴは、15ヌクレオチドだけその隣と重複し、そしてこの最終MHCクラスIIエピートープ列を、PCRを用いる3セットの反応で、この重複オリゴヌクレオチドを伸長することによりアセンブルした。この3つのオリゴヌクレオチドは：オリゴ1、ヌクレオチド241～310、CTTCGCATGAAGCTTATCAGCCAGGCTGTGCACGCCGCTCACGCCGAAATCAACGAAGCTGGAAGAACCC(配列番号44)；

オリゴ2、ヌクレオチド364～295、TTCTGGTCAGCAGAAAGAACAGGATAGGAGCGTTTGAGGGGCGATAAGCTGGAGGGGGTTCTTCCAGCTTC(配列番号45)；および

オリゴ3、ヌクレオチド350～42、TTCTGCTGACCAGAATCCTGACAAATCCCCCAGTCCCTGGACGCCAAGTTCGTGGCTGCCTGGACCCTGAAG(配列番号46)であった。

【0127】

最初のPCR反応には、5 μ gのオリゴ1および2を、Pfuポリメラーゼを含む100 μ l反応物中で組み合わせた。Perkin/Elmer 9600 PCRマシンを用い、そして用いたアニーリング温度は45℃であった。PCR産物をゲル精製し、そしてオリゴ3と、オリゴ1および2のPCR産物を含む第2の反応物をアニールし、そして「メガプライマー」として用いられるべき完全長産物のゲル精製の前に、10サイクルの間伸長した。

【0128】

このI80T構築物は、murIi-FおよびメガプライマーでbIi#3を増幅することにより作製した。サイクリング条件は：95℃の1サイクル5分間、次いで95℃15秒間、37℃30秒間、および72℃1分間の5サイクルであった。プライマーHelper-pRを添加し、そしてさらなる25サイクルを、47℃に高められたアニーリング温度で実施した。このHelper-pRプライ

マーGGTACCTCAAGCGGCAGCCTTCAGGGTCCAGGCA
 (配列番号47)はヌクレオチド438～405に対応する。上記のように、完全長I80T産物を単離し、クローン化し、そして配列決定する。

【0129】

このI80T構築物(図2)は、オボアルブミンのアミノ酸残基323～339(IleSerGlnAlaValHisAlaAlaHisAlaGluIleAsnGluAlaGlyArg;配列番号48);HBVコア抗原のアミノ酸残基128～141(アミノ酸ThrProProAlaTyrArgProProAsnAlaProIleLeu;配列番号49);HBV envのアミノ酸残基182～196(アミノ酸PhePheLeuLeuThrArgIleLeuThrIleProGlnSerLeuAsp;配列番号50);および配列番号38で示される汎DR配列、に対応する一連の複数のMHCクラスIIエピトープに融合した、細胞質ドメイン、膜貫通ドメインおよび管腔ドメインの一部を含む、Iiのアミノ酸残基1～80をコードする。

【0130】

図2に示される、MHCクラスIIエピトープ列に融合した、Iiの細胞質ドメイン、膜貫通ドメインおよび管腔ドメインの一部、ならびにIiの三量体化領域をコードするIiのアミノ酸残基101～215を含むDNA構築物を生成した(図3)。IiThfullと称するこの構築物は、(CLIPを置換する)MHCクラスIIエピトープ列および不変異体鎖の残り(アミノ酸101～215)に続く不変異体鎖の最初の80のアミノ酸をコードする。要約すれば、この構築物は、アニールされ、そしてPCRにより伸長されて最終産物を生じる、2つの重複する半分として生成された。

【0131】

IiThfullの5'末端を、murIi-F(配列番号40)およびTh-Pad-RでI80Tを増幅することにより作製した。このTh-Pad-RプライマーAGCGGCAGCCTTCAGGGTC(配列番号51)は、ヌクレオチド429～411に対応する。3'の半分は、IiPADRE-FおよびmurIi-R(配列番号41)でbIi#3を増幅することにより作製した。

この I i P A D R E - F プライマー G G C T G C C T G G A C C C T G A A G G C T G C C G C T A T G T C C A T G G A T A A C (配列番号 52) は、ヌクレオチド 402 ~ 444 に対応する。各 P C R 産物をゲル精製し、そして混合し、次いで P C R の 5 サイクルにより変性し、アニールし、そして伸長した。プライマー m u r I i - F (配列番号 40) および m u r I i - R (配列番号 41) を添加し、そして別の 25 サイクルを実施した。完全長産物をゲル精製し、クローン化し、そして配列決定した。

【0132】

以下に記載の残りの構築物のすべては、図 18 に示されるスキームに本質的に従って作製された。要約すれば、各特定の構築物について以下に称される、プライマー対 1 F プラス 1 R を用いて、特定のシグナル配列を増幅し、そして M H C クラス I I エピトープ列の 5' 末端に同一である重複する 15 塩基対テイルを含んだ。プライマー対 T h - o v a - F、A T C A G C C A G G C T G T G C A C G C (配列番号 53)、プラス T h - P a d - R (配列番号 51) を用いて M H C クラス I I エピトープ列を増幅した。15 塩基対の重複、および標的化シグナルを含む特異的膜貫通ならびに細胞質テイルを、プライマー対 2 F プラス 2 R で増幅した。

【0133】

各 c D N A の 3 つすべての断片は、以下の条件を用いて増幅した：95℃の 1 サイクル 5 分間、次いで 95℃ 15 秒間、52℃ 30 秒間、および 72℃ 1 分間の 30 サイクル。3 つのフラグメントの各々をアガロースゲル精製し、そしてシグナル配列および M H C クラス I I 列フラグメントを組み合わせ、そして第 2 の P C R における 5 サイクルにより連結した。5 サイクルの後、プライマー 1 F および T h - P a d - R を、さらなる 25 サイクルについて添加し、そして P C R 産物をゲル精製した。このシグナル配列プラス M H C クラス I I エピトープ列フラグメントを、最終 P C R のために、膜貫通プラス細胞質テイルフラグメントと組み合わせた。5 サイクルの後、プライマー 1 F プラス 2 R を、さらなる 25 サイクルについて添加し、そして産物をゲル精製し、クローン化し、そして配列決定した。

【0134】

図2に示すTヘルパーエピトープ列に融合したマウス免疫グロブリン κ シグナル配列、およびLAMP-1の膜貫通および細胞質ドメインを含むDNA構築物を生成し(図4)(Grangerら、J. Biol. Chem. 265:12036~12043(1990))、これは参考として援用される(マウスLAMP-1 GenBank受託番号M32015)。 κ AMP-Thと称するこの構築物は、コンセンサスマウス免疫グロブリン κ シグナル配列を含み、そして図18に示されるように、完全長免疫グロブリン κ を含むプラスミドから増幅された。用いたプライマー1Fは、KappaSig-Fと称するオリゴヌクレオチド、GCTAGCGCCGCCACCATGGGAATGCAG(配列番号54)であった。

【0135】

用いたプライマー1Rは、Kappa-Th-Rと称するオリゴヌクレオチド、CACAGCCTGGCTGATTCTCTGGACCC(配列番号55)であった。

【0136】

用いたプライマー2Fは、PAD/LAMP-Fと称するオリゴヌクレオチド、CTGAAGGCTGCCGCTAACAACATGTTGATCCCC(配列番号56)であった。用いたプライマー2Rは、LAMP-CYTORと称するオリゴヌクレオチド、GGTACCCTAGATGGTCTGATAGCC(配列番号57)であった。

【0137】

図2に示すMHCクラスIIエピトープ列に融合したH2-Mのシグナル配列、ならびにH2-Mの膜貫通および細胞質ドメインを含むDNA構築物を生成した(図5)。このマウスH2-M遺伝子は、先に記載され、Pelleriauxら、Immunogenetics 43:204~214(1996)、これは本明細書に参考として援用される。この構築物は、H2M-Thと称され、そして図18に示されるように構築された。用いたプライマー1Fは、H2-Mb-1Fと称されるオリゴヌクレオチド、GCC GCT AGC GCC GCC

ACC ATG GCT GCA CTC TGG (配列番号58)であった。
 用いたプライマー1Rは、H2-Mb-1Rと称されるオリゴヌクレオチド、
 CAC AGC CTG GCT GAT CCC CAT ACA GTG
 CAG (配列番号59)であった。用いたプライマー2Fは、H2-Mb-2F
 と称されるオリゴヌクレオチド、CTG AAG GCT GCC GCT A
 AG GTC TCT GTG TCT (配列番号60)であった。用いたプ
 ライマー2Rは、H2-Mb-2Rと称されるオリゴヌクレオチド、GCG GG
 T ACC CTA ATG CCG TCC TTC (配列番号61)であ
 った。

【0138】

図2に示すMHCクラスIIエピトープ列に融合したH2-D_Oのシグナル配
 列、ならびにH2-D_Oの膜貫通および細胞質ドメインを含むDNA構築物を生
 成した(図6)。このマウスH2-M遺伝子は、先に記載され(Larhamm
 arら、J. Biol. Chem. 260:14111~14119 (1985
))、これは、本明細書に参考として援用される(GenBank受託番号M1
 9423)。H2-O_{Th}と称されるこの構築物は、図18に示されるように構
 築された。用いたプライマー1Fは、H2-O_b-1Fと称されるオリゴヌクレ
 オチド、GCG GCT AGC GCC GCC ACC ATG GGC
 GCT GGG AGG (配列番号62)であった。用いたプライマー1Rは、
 H2-O_b-1Rと称されるオリゴヌクレオチド、TGC ACA GCC T
 GG CTG ATG GAA TCC AGC CTC (配列番号63)であ
 った。用いたプライマー2Fは、H2-O_b-2Fと称されるオリゴヌクレオチ
 ド、CTG AAG GCT GCC GCT ATA CTG AGT GG
 A GCT (配列番号64)であった。用いたプライマー2Rは、H2-O_b-
 2Rと称されるオリゴヌクレオチド、GCC GGT ACC TCA TGT
 GAC ATG TCC CG (配列番号65)であった。

【0139】

インフルエンザマトリックスタンパク質のアミノ末端に融合した、汎DRエ
 ピトープ配列(配列番号38)を含むDNA構築物を生成する(図7)。PADR

E-インフルエンザマトリックスと称されるこの構築物は、インフルエンザマトリックスコード配列のアミノ末端に付着した、ユニバーサルMHCクラスIIエピトープPADREを含む。この構築物は、5'末端プライマー上の長プライマーを用いて作製される。この5'プライマーは、オリゴヌクレオチド、GCTAGCGCCGCCACCATGGCCAAGTTCGTGGCTGCCTGGACCTGGAAGGCTGCCGCTATGAGTCTTCTAACCGAGGTCGA（配列番号66）である。3'プライマーは、オリゴヌクレオチド、TCACTTGAATCGCTGCATCTGCACCCCCCAT（配列番号67）である。America Type Tissue Collection（ATCC）からのインフルエンザウイルスを、マトリックスコード領域の供給源として用い（Perdueら、Science 279:393~396（1998））、これは参考として本明細書に援用される（GenBank受託番号AF036358）。

【0140】

HBV-S抗原のアミノ末端に融合した汎DRエピトープ配列（配列番号38）を含むDNA構築物を生成した（図8）。この構築物は、PADRE-HBV-sと称され、そしてB型肝炎表面抗原のアミノ末端上にPADREを付加するために、2つの重複するオリゴヌクレオチドをアニールすることにより生成した（Michelら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81:7708~7712（1984）；Michelら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 92:5307~5311（1995））、その各々は、参考として本明細書に援用される。1つのオリゴヌクレオチドは、GCTAGCGCCGCCACCATGGCCAAGTTCGTGGCTGCCTGGACCTGGAAGGCTGCCGCTC（配列番号68）であった。第2のオリゴヌクレオチドは、CTCGAGAGCGGCAGCCTTCAGGGTCCAGGCAGCCACGAACCTTGGCCATGGTGGCGGCG（配列番号69）であった。アニールされたとき、このオリゴは、NheIおよびXhoI粘着末端を有する。このオリゴを、100℃まで熱し、そしてゆっくり室温まで冷却してアニールする。3部連結は、HBV-s抗原を含むXhoI-KpnIフラ

グメントをもつPADREを、発現ベクターのNheIプラスKpnI部位中に連結した。

【0141】

図2に示されるMHCクラスIIエピトープ列に融合したIg- α のシグナル配列、およびIg- α の膜貫通および細胞質ドメインを含むDNA構築物を生成した(図9)。このマウスIg- α 遺伝子は、先に記載されており(Kashiwamuraら、J. Immunol. 145:337~343(1990))、これは、参考として本明細書に援用される(GenBank受託番号M31773)。Ig- α Thと称されるこの構築物は、図18に示されるように構築された。用いたプライマー1Fは、Ig α -1Fと称されるオリゴヌクレオチド、GCG GCT AGC GCC GCC ACC ATG CCA GGG GGT CTA(配列番号70)であった。用いたプライマー1Rは、Ig α -1Rと称されるオリゴヌクレオチドGCA CAG CCT GGC TGA TGG CCT GGC ATC CGG(配列番号71)であった。用いたプライマー2Fは、Ig α -2Fと称されるオリゴヌクレオチド、CTG AAG GCT GCC GCT GGG ATC ATC TTG CTG(配列番号72)であった。用いたプライマー2Rは、Ig α -2Rと称されるオリゴヌクレオチド、GCG GGT ACC TCA TGG CTT TTC CAG CTG(配列番号73)であった。

【0142】

図2に示されるMHCクラスII列に融合したIg- β のシグナル配列、およびIg- β の膜貫通および細胞質ドメインを含むDNA構築物を生成した(図10)。このIg- β 配列は、マウスのB29遺伝子であり、そして先に記載され(Hermansonら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:6890~6894(1988))、これは、参考として本明細書に援用される(GenBank受託番号J03857)。Ig- β Thと称されるこの構築物は、図18に示されるように構築された。用いたプライマー1Fは、B29-1F(33マー)と称されるオリゴヌクレオチド、GCG GCT AGC GCC GCC ACC ATG GCC ACA CTG GTG(配列番号7

4)であった。用いたプライマー1Rは、B29-1R(30マー)と称されるオリゴヌクレオチド、CAC AGC CTG GCT GAT CGG CTC ACC TGA GAA(配列番号75)であった。用いたプライマー2Fは、B292F(30マー)と称されるオリゴヌクレオチド、CTG AAG GCT GCC GCT ATT ATC TTG ATC CAG(配列番号76)であった。用いたプライマー2Rは、B29-2R(27マー)と称されるオリゴヌクレオチド、GCC GGT ACC TCA TTC CTG GCC TGG ATG(配列番号77)であった。

【0143】

図2に示されるMHCクラスIIエピトープ列に融合した κ 免疫グロブリンのシグナル配列を含むDNA構築物を構築した(図11)。この構築物は、SigThと称され、そして κ LAMP-Th構築物(図4に示される)を用いること、およびプライマー対KappaSig-F(配列番号54)プラスHelperpR(配列番号47)で増幅しSigThを作製することにより生成した。SigThは、Tヘルパーエピトープ列に融合し、そして翻訳停止コドンで終わる κ 免疫グロブリンシグナル配列を含む。

【0144】

マウス配列を有する上記に記載の構築物に対応するヒト配列をコードする構築物を、マウス配列をヒト配列で置換することにより調製する。要約すれば、図1に対応するIiPADRE構築物には、ヒトIi遺伝子HLA-DR配列(図12)(GenBank受託番号X00497 M14765)からのアミノ酸残基1~80を、PADREに融合されたマウスIi配列の代わりに置き換え、ヒト不変異体鎖HLA-DRアミノ酸残基114~223が続く。図2に対応するI80T構築物には、Iiのヒト配列からのアミノ酸残基1~80の後にMHCクラスIIエピトープ列が続く。図3に対応するIiThfull構築物には、MHCクラスIIエピトープ列に融合される、Iiのヒト配列からのアミノ酸残基1~80の後にヒト不変異体鎖アミノ酸残基114~223が続く。

【0145】

LAMP-Th構築物について、図4と同様に、ヒトLAMP-1(図13)

(GenBank登録番号J04182)のアミノ酸残基1～19(ヌクレオチド11～67)によってコードされるシグナル配列(これは、MHCクラスIIエピトープストリングに融合される)に続いて、ヒトLAMP-1のアミノ酸残基380-416によってコードされる膜貫通領域(ヌクレオチド1163-1213)および細胞質テイル領域(ヌクレオチド1214-1258)が存在する。

【0146】

図5に対応するHLA-DM-Th構築物について、ヒトHLA-DMB(図14)(GenBank登録番号U15085)のアミノ酸残基1-17(ヌクレオチド1-51)によってコードされるシグナル配列(これは、MHCクラスIIエピトープストリングに融合されている)に続いて、ヒトHLA-DMBのアミノ酸残基216-263によってコードされる膜貫通領域(ヌクレオチド646-720)および細胞質テイル領域(ヌクレオチド721-792)が存在する。

【0147】

図6に対応するHLA-DO-Th構築物について、ヒトHLA-DO(図15)(GenBank登録番号L29472 J02736 N00052)のアミノ酸残基1-21(ヌクレオチド1-63)によってコードされるシグナル配列(これは、MHCクラスIIエピトープストリングに融合されている)に続いて、ヒトHLA-DOのアミノ酸残基223-273によってコードされる膜貫通領域(ヌクレオチド685-735)および細胞質テイル領域(ヌクレオチド736-819)が存在する。

【0148】

図9に対応するIg- α Th構築物について、ヒトIg- α MB-1(図16)(GenBank登録番号U05259)のアミノ酸残基1-29(ヌクレオチド1-87)によってコードされるシグナル配列(これは、MHCクラスIIエピトープストリングに融合されている)に続いて、ヒトIg- α MB-1のアミノ酸残基142-226によってコードされる膜貫通領域(ヌクレオチド424-498)および細胞質テイル領域(ヌクレオチド499-678)が存在

する。

【0149】

図10に対応するI g- β Th構築物について、ヒトI g- β B29 (図17) (GenBank登録番号M80461) のアミノ酸残基1-28 (ヌクレオチド17-100) によってコードされるシグナル配列 (これは、MHCクラスIIエピトープストリングに融合されている) に続いて、ヒトI g- β のアミノ酸残基156-229によってコードされる膜貫通領域 (ヌクレオチド500-547) および細胞質テイル領域 (ヌクレオチド548-703) が存在する。

【0150】

図11に示されるSigTh構築物は、マウスおよびヒトにおいて使用され得る。あるいは、シグナル配列を含む適切なヒト遺伝子に由来するシグナル配列は、SigTh構築物においてマウス κ イムノグロブリン配列について置換され得る。

【0151】

図7に示されるPADRE-インフルエンザマトリクス構築物および図8に示されるPADRE-HBV構築物は、マウスおよびヒトにおいて使用され得る。

【0152】

上記に記載されるDNA構築物のいくつかを、ベクターpEP2 (図19; 配列番号35) 中にクローニングした。pEP2ベクターを、二連のCMVプロモーターを含むように構築した。このpEP2ベクターは、InvitrogenからのpcDNA3.1 (-) Myc-His AのバックボーンおよびClontechからのpIRES1hygを使用した。pIRES1hygからのCMV転写物単位を改変されたpcDNAベクターに対して移動させる前に、両方のベクターに対して、変化を施した。

【0153】

このpcDNA3.1 (-) Myc-His Aベクター (<http://www.invitrogen.com>) を改変した。手短には、このPvuIIフラグメント (ヌクレオチド1342-3508) を欠失させた。アンピシリン

耐性遺伝子（ヌクレオチド4404-5412）を含むABspHIフラグメントを切り出した。このアンピシリン耐性遺伝子を、pUC4K（GenBank登録番号X06404）からのカナマイシン耐性遺伝子に置き換えた。pUC4Kを、以下のプライマーセットを用いて増幅した：TCTGATGTTACATTGCACAAAG（配列番号78）（ヌクレオチド1621-1601）およびGCGCACTCATGATGCTCTGCCAGTGTTACAACC（配列番号79）（ヌクレオチド682-702および5'末端側のBspHI制限部位の付加）。このPCR産物をBspHIで消化し、そしてBspHIを用いて消化したベクターへと連結した。ヌクレオチド905でのPmeI部位と、ヌクレオチド947でのEcoRV部位との間の領域を欠失させた。次いで、このベクターをPmeI（ヌクレオチド1076での切断）およびApaI（ヌクレオチド1004での切断）を用いて消化し、接着末端にてクレノウ充填し、そして連結した。ヌクレオチド994でのKpnI部位を、KpnIで消化し、そしてクレノウDNAポリメラーゼを用いて末端を充填し、そして連結することによって欠失させた。CMV（GenBank登録番号M21295、ヌクレオチド635-1461）からのイントロンA配列を、以下のプライマーセットを用いてCMV DNAを増幅することによって付加した：GCGTCTAGAGTAAGTACCGCCTATAGACTC（配列番号80）（ヌクレオチド635-655および5'末端におけるXbaI部位）およびCCGGCTAGCCTGCAGAAAAGACCCATGGAA（配列番号81）（ヌクレオチド1461-1441および3'末端におけるNheI部位）。このPCR産物を、XbaIおよびNheIを用いて消化し、そしてこのベクターのNheI部位（もとのpcDNAベクターのヌクレオチド895）へと連結し、その結果、このNheI部位が、そのイントロンの3'末端に存在した。

【0154】

pIRES1hygベクター（GenBank登録番号U89672、Clontech）を改変するために、KpnI部位（ヌクレオチド911）を、切断し、そしてクレノウを用いて充填することによって欠失させた。このプラスミドをNotI（ヌクレオチド1254）およびXbaI（ヌクレオチド3196）

を用いて切断し、そしてポリリンカーオリゴをその部位へと挿入した。このポリリンカーを、以下の2つのオリゴをアニールさせることによって形成した：GGCCGCAAGGAAAAAATCTAGAGTCGGCCATAGACTAATGCCGGTACCG（配列番号82）およびCTAGCGGTACCGGCATTAGTCTATGGCCCGACTCTAGATTTTTTTCCTTGC（配列番号83）。得られるプラスミドを、HincIIを用いて切断し、そしてHincII部位234と3538との間のフラグメントを単離し、そして改変したpcDNAベクターへと連結した。このフラグメントは、CMVプロモーター、イントロン、ポリリンカーおよびポリアデニル化シグナルを含む。

【0155】

pIREShyg片およびpcDNA片を合わせてpEP2を形成した。改変したpcDNA3.1（-）Myc-HisAベクターを、PvuIIを用いて部分的に消化して、pcDNAポリアデニル化シグナルの切断下流を有する直鎖状のフラグメントを単離した（他のPvuII部位は、CMVイントロンである）。改変されたpIRES1hygベクターからのHincIIフラグメントを、PvuII切断ベクターへと連結した。pcDNAに由来する転写単位からのポリアデニル化シグナルを、EcoRI（pcDNAヌクレオチド955）およびXhoI（pIRES1hygヌクレオチド3472）を用いて消化することによって欠失させ、そして合成ポリアデニル化配列に置き換えた。この合成ポリアデニル化シグナルは、Levittrら、Genes and Development 3:1019-1025（1989）に記載されている。

【0156】

2つのオリゴをアニールして、EcoRIおよびXhoIの接着末端を有するポリリンカーおよびポリアデニル化シグナルを含む1つのフラグメントを生成した。このオリゴは、以下のとおりであった：AATTCGGATATCCAAGCTTGATGAATAAAAGATCAGAGCTCTAGTGATCTGTGTGTTGGTTTTTTTGTGTGC（配列番号84）およびTCGAGCACACAAAAAACCAACACACAGATCACTAGAGCTCTGATCTTTTTTATTCATCAAGCTTGGATATCCG（配列番号

85)。

【0157】

得られたベクターを、pEP2と命名し、そしてこのベクターは2つの別個の転写単位を含む。両方の転写単位は、同じCMVプロモーターを使用するが、各々は、異なるイントロン、ポリリンカーおよびポリアデニル化配列を含む。

【0158】

pEP2ベクターは、2つの転写単位を含む。この第一の転写単位は、当初はpcDNA(図19におけるヌクレオチド210-862)からのCMVプロモーター、CMVイントロンA配列(図19におけるヌクレオチド900-1728)、ポリリンカークローニング部位(図19におけるヌクレオチド1740-1760)および合成ポリアデニル化シグナル(図19におけるヌクレオチド1764-1769)を含む。この第二の転写単位(これは、当初はpIRES1hygに由来した)は、CMVプロモーター(図19におけるヌクレオチド3165-2493)、イントロン配列(図19におけるヌクレオチド2464-2173)、ポリリンカークローニング部位(図19におけるヌクレオチド2126-2095)およびウシ成長ホルモンポリアデニル化シグナル(図19におけるヌクレオチド1979-1974)を含む。カナマイシン耐性遺伝子は、ヌクレオチド4965-4061(図19)においてコードされる。

【0159】

上記のDNA構築物を、NheIおよびKpnIを用いて消化し、そしてpEP2(第二転写単位)のXbaIおよびKpnI部位中にクローニングした。

【0160】

さらなるベクターもまた構築した。MHCクラスIエピトープとMHCクラスIIエピトープとの同時発現の効果について試験するために、9つのMHCクラスIエピトープを含むインサートを生成し、AOSと命名した。このAOSインサートを、ベクターpMIN.0(図20;配列番号36)においてまず構築した。手短には、このAOSインサートは、9つのMHCクラスIエピトープ(HLA-A2によって制限される6つおよびHLA-A11によって制限される3つ)およびユニバーサルMHCクラスIIエピトープPADREを含む。このベ

クター pMIN. 0 は、HBV、HIVからのエピトープおよびマウスオボアルブミンエピトープを含む。このMHCクラスIエピトープは、pMIN. 0において、以下の順で現れる。：

ヌクレオチドATG CAG GTG CAG ATC CAG AGC CTG TTT CTG CTC CTC CTG TGG GTG CCC GGG TCC AGA GGA (配列番号87) によってコードされるコンセンサスマウスIg κ シグナル配列 (pMIN. 0アミノ酸残基1-20、ヌクレオチド16-81) MQVQIQSLFLLLWVPGSRG (配列番号86) ；

ヌクレオチドCAC ACC CTG TGG AAG GCC GGA ATC CTG TAT AAG (配列番号89) によってコードされるHBV pol 149-159 (A11制限される) (pMIN. 0 アミノ酸残基21-31、ヌクレオチド82-114) HTLWKAGILYK (配列番号88) ；ヌクレオチドGCC AAG TTC GTG GCT GCC TGG ACC CTG AAG GCT GCC GCT (配列番号90) によってコードされるPADRE-ユニバーサルMHCクラスIIエピトープ (pMIN. 0 アミノ酸残基32-45、ヌクレオチド115-153) AKFVAAWTLKAAA (配列番号38) ；ヌクレオチドTTC CTG CCT AGC GAT TTC TTT CCT AGC GTG (配列番号92) によってコードされるHBVコア18-27 (A2制限される) (pMIN. 0 アミノ酸残基46-55、ヌクレオチド154-183) FLPSDFFPSTV (配列番号91) ；ヌクレオチドAAG CTG ACC CCA CTG TGC GTG ACC CTG (配列番号94) によってコードされるHIV env 120-128 (A2制限される) (pMIN. 0 アミノ酸残基56-64、ヌクレオチド184-210) KLTPLCVTL (配列番号93) ；ヌクレオチド TAT ATG GAT GAC GTG GTG CTG GGA GCC (配列番号96) によってコードされるHBV pol 551-559 (A2制限される) (pMIN. 0 アミノ酸残基65-73、ヌクレオチド211-237) YMDDVVLGA (配列番号95) ；ヌクレオチドAGC AT

C A T C A A C T T C G A G A A G C T G (配列番号98) によってコードされるマウスオボアルブミン257-264 (K^b制限される) (pMIN. 0 アミノ酸残基74-81、ヌクレオチド238-261) S I I N F E K L (配列番号97) ;ヌクレオチド G G A C T G T C C A G A T A C G T G G C T A G G C T G (配列番号100) によってコードされるHBV pol 455-463 (A2制限される) (pMIN. 0 アミノ酸残基82-90、ヌクレオチド262-288) G L S R Y V A R L (配列番号99) ;ヌクレオチド A T C C T G A A G G A G C C T G T G C A C G G C G T G (配列番号102) によってコードされるHIV pol 476-84 (A2制限される) (pMIN. 0 アミノ酸残基91-99、ヌクレオチド289-315) I L K E P V H G V (配列番号101) ;ヌクレオチドT C C A C C C T G C C A G A G A C C A C C G T G G T G A G G A G A (配列番号104) によってコードされるHBVコア141-151 (A11制限される) (pMIN. 0 アミノ酸残基100-110、ヌクレオチド316-348) S T L P E T T V V R R (配列番号103) ;ヌクレオチドA C C G T G T A C T A T G G A G T G C C T G T G T G G A A G (配列番号106) によってコードされるHIV env 49-58 (A11制限される) (pMIN. 0 アミノ酸残基111-120、ヌクレオチド349-378) T V Y Y G V P V W K (配列番号105) ; およびヌクレオチド T G G C T G A G C C T G C T G G T G C C C T T T G T G (配列番号108) によってコードされるHBV env 335-343 (A2制限される) (pMIN. 0 アミノ酸残基121-129、ヌクレオチド378-405) W L S L L V P F V (配列番号107)。

【0161】

pMIN. 0 ベクターは、K p n I 制限部位 (pMIN. 0ヌクレオチド406-411) およびN h e I 制限部位 (pMIN. 0ヌクレオチド1-6) を有する。このpMIN. 0ベクターは、コンセンサスK o z a k 配列 (ヌクレオチド7-18) (G C C G C C A C C A T G ; 配列番号109) およびマウス κ I g - 軽鎖シグナル配列に続いて10個のM H C クラスI エピトープのストリン

グおよび1つのユニバーサルMHCクラスIIエピトープを含む。pMIN. 0配列は、p cDNA 3.1 Myc-HisベクターによってコードされるMycおよびHisの抗体エピトープタグに融合されたオープンリーディングフレームをコードする。このpMIN. 0ベクターを、8つのオリゴヌクレオチドを用いて構築した。

【0162】

Min1オリゴ

GAGGAGCAGAAACAGGCTCTGGATCTGCACCTGCAT
TCCCATGGTGGCGGCGCTAGCAAGCTTCTTGCGC (配
列番号110) ;

Min2オリゴ

CCTGTTTCTGCTCCTCCTGTGGGTGCCCGGGTCCAG
AGGACACACCCTGTGGAAGGCCGGAATCCTGTATA (配
列番号111) ;

Min3オリゴ

TCGCTAGGCAGGAAAGCGGCAGCCTTCAGGGTCCAG
GCAGCCACGAACCTTGGCCTTATACAGGATTCCGG (配
列番号112) ;

Min4オリゴ

CTTTCCTGCCTAGCGATTTCTTTCTCCTAGCGTGAAGC
TGACCCCACTGTGCGTGACCCCTGTATATGGATGAC (配
列番号113) ;

Min5オリゴ

CGTACCTGGACAGTCCCAGCTTCTCGAAGTTGATG
ATGCTGGCTCCCAGCACCCACGTCATCCATATACAG (配
列番号114) ;

Min6オリゴ

GGACTGTCCAGATACGTGGCTAGGCTGATCCTGAAG
GAGCCTGTGCACGGCGTGTCCACCCTGCCAGAGAC (

配列番号115) ;

Min7オリゴ

GCTCAGCCACTTCCACACAGGCACTCCATAGTACAC
GGTCCTCCTCACCCACGGTGGTCTCTGGCAGGGTG (配
列番号116) ;

Min8オリゴ

GTGGAAGTGGCTGAGCCTGCTGGTGCCCTTTGTGGG
TACCTGATCTAGAGC (配列番号117) 。

【0163】

さらなるプライマーは、隣接プライマー5'、GCG CAA GAA GC
T TGC TAG CG (配列番号118) および隣接プライマー3'、GC
T CTA GAT CAG GTA CCC CAC (配列番号119) であ
った。

【0164】

もとのpMIN. 0ミニ遺伝子構築を、平均約70ヌクレオチド長の8つの重
複するオリゴ (Operon Technologies Incによって合成
され、そしてHPLC精製された) を用いて行った。各オリゴは、15ヌクレオ
チドだけその隣接のものと重複し、そして最後のマルチエピトープミニ遺伝子を
、PCRを用いた3セットの反応において重複するオリゴを伸長することによっ
てアセンブルした (Hofら、Gene 77:51-59 (1989)) 。

【0165】

最初のPCR反応について、5 μ gの各2つのオリゴをアニールさせ、そして
伸長した。1+2、3+4、5+6および7+8を、Pfuポリメラーゼ緩衝液
(10mM KCl、10mM (NH₄)₂SO₄、20mM Tris-Cl、
pH8.75、2mM MgSO₄、0.1% TRITON X-100およ
び100mg/ml BSAを含む) 中に0.25mMの各dNTPおよび2.
5単位のPfuポリメラーゼを含む100 μ lの反応物中で合わせた。Perk
in/Elmer 9600 PCR機械を使用した。そして使用したアニール
温度は、各プライマー対の計算された最低のT_mよりも5℃低かった。全長ダイ

マー産物をゲル精製し、そして1-2および3-4の産物、ならびに5-6および7-8の産物を含む2つの反応物を混合し、10サイクルアニールし、そして伸長した。次いで、2つの反応物の半分を混合し、そしてアニールおよび伸長を5サイクル行い、その後、隣接プライマーを添加して、さらに25サイクルの間全長産物を増幅した。この全長産物をゲル精製し、そしてpCR-blunt (Invitrogen) 中にクローニングし、そして個々のクローンを配列決定することによってスクリーニングした。このMin挿入をNheI-KpnIフラグメントとして単離し、そして発現のためにpcDNA3.1(-)/Myc-His A (Invitrogen) の同じ部位中にクローニングした。このMinタンパク質は、MycおよびHisの抗体エピトープタグをそのカルボキシ末端に含む。

【0166】

すべての記載されるPCR反応について、合計30サイクルを、Pfuポリメラーゼおよび以下の条件を用いて行った：95℃で15秒間、アニール温度で30秒間、72℃で1分間。使用したアニール温度は各プライマー対の計算されるTmよりも5℃低かった。

【0167】

pMIN.0に対する3つの変化を施して、pMIN.1 (図21；配列番号37、pMIN-AOSともいう) を産生した。このマウスovaエピトープを除去し、HBV pol 551-560の9位のアラニンアンカー残基(#547)を、バリンへと変換した。これは、インビトロ結合アフィニティーを40倍増加させ、そして翻訳終止コドン、マルチエピトープコード配列の末端に導入した。2つの重複するフラグメントを増幅し、そしてそのフラグメントを合わせることによってこの変化を行って、全長産物を得た。

【0168】

第一の反応は、5' pcDNAベクタープライマーT7およびプライマーMin-ovaR (ヌクレオチド247-218) TGGACAGTCCCACTCCAGCACCACTCAT (配列番号120) を使用した。この3'の半分を、以下のプライマーを使用して増幅した：Min-ovaF (ヌクレオチド

228-257) GCTGGGAGTGGGACTGTCCAGGTACGTGGC (配列番号121) およびMin-StopR (ヌクレオチド390-361) GGTAACCTCACACAAAGGGCACCAGCAGGC (配列番号122)。

【0169】

この2つのフラグメントを、ゲル精製し、混合し、変性し、アニールし、そしてPCRの5つのサイクルを用いて充填した。この全長フラグメントを、隣接プライマーT7およびMin-Stopを用いてさらに25サイクル増幅した。この産物を、ゲル精製し、NheIおよびKpnIを用いて消化し、そして配列決定および発現のためにpcDNA3.1中にクローニングした。pMin.1からのインサートを、NheI-KpnIフラグメントとして単離し、そしてpEPP2中にクローニングしてpEPP2-AOSを作製した。

【0170】

(実施例II：Tヘルパー細胞活性化についてのアッセイ)

本実施例は、Tヘルパー細胞活性をアッセイするための方法を示す。Tヘルパー細胞活性をアッセイするための1つの方法は、免疫された生物の脾細胞を使用する。手短には、脾細胞ペレットを、0.001M Tris-HCl、pH 7.5中に8.3g/Lの塩化アンモニウムを含む2~3mlの赤血球細胞溶解緩衝液を用いて懸濁する。この細胞を、室温にて時折ボルテクスしながら3~5分間溶解緩衝液中にてインキュベートする。過剰容量の50mlのR10培地をこの細胞に添加し、そしてその細胞をペレット化する。この細胞を再懸濁し、そして1回または2回R2培地またはR10培地中でペレット化する。

【0171】

この細胞ペレットを、R10培地中に懸濁し、そして計数する。この細胞懸濁物が凝集する場合、この凝集物を、濾過によってかもしくはその凝集物を重力によって沈降させることによって除去した。この細胞の濃度を $10^7/\text{ml}$ とし、そして100 μl の脾細胞を96ウェルの平底プレートに添加する。

【0172】

適切なペプチド (例えば、汎DRエピトープ (配列番号145)) の希釈物を

、R10培地中に、 $100\mu\text{g}/\text{ml}$ 、 $10\mu\text{g}/\text{ml}$ 、 $1\mu\text{g}/\text{ml}$ 、 $0.1\mu\text{g}/\text{ml}$ および $0.01\mu\text{g}/\text{ml}$ で調製し、そして $100\mu\text{l}$ のペプチドを、脾細胞の二連または三連のウェルに加える。最終ペプチド濃度は、 $50\mu\text{g}/\text{ml}$ 、 $5\mu\text{g}/\text{ml}$ 、 $0.5\mu\text{g}/\text{ml}$ 、 $0.05\mu\text{g}/\text{ml}$ および $0.005\mu\text{g}/\text{ml}$ である。コントロールウェルには、 $100\mu\text{l}$ のR10培地を与える。

【0173】

このプレートを、3日間 37°C でインキュベートする。3日後、 $20\mu\text{l}$ の $50\mu\text{Ci}/\text{ml}$ の ^3H -チミジンを1ウェルあたりに加える。細胞を、18～24時間インキュベートし、次いで、ガラスファイバーフィルター上に採取する。増殖している細胞のDNAへの ^3H -チミジンの取り込みを、 β カウンターにおいて測定する。

【0174】

Tヘルパー細胞活性についての第二のアッセイは、Alexanderら、前出およびSette (WO 95/07, 707) に記載されるように、Manceraら、J. Immunol. 146:1964-1971 (1991) から適応されるように（これは、本明細書において参考として援用される）、インビトロで刺激される末梢血単核細胞 (PBMC) を使用する。手短には、PBMCを健常なドナーから収集し、そしてFicoll-Plaque (Pharmacia Biotech; Piscataway, NJ) を用いて精製する。PBMCを、24ウェルの組織培養プレートにて、 4×10^6 細胞/ ml でプレートする。ペプチドを、 $10\mu\text{g}/\text{ml}$ の最終濃度にて添加する。培養物を、5%の CO_2 中で 37°C でインキュベートする。

【0175】

第4日目に、組換えインターロイキン-2 (IL-2) を、最終濃度 $10\mu\text{g}/\text{ml}$ で添加する。培養物に、 1ml の培地を吸引し、そしてIL-2を含む新鮮な培地に置き換えることによって3日おきに給餌する。抗原を用いたT細胞の2回のさらなる刺激をおよそ14日目および28日目にて行う。このT細胞 (3×10^5 /ウェル) を、ペプチド ($10\mu\text{g}/\text{ml}$) を用い、自己PBMC細胞

(2×10^6 の照射した細胞/ウェル) (7500 ラドで照射した) を抗原提示細胞として使用して、 24 ウェル組織培養プレートの合計 3 つのウェルにおいて、刺激した。さらに、 14 日目および 28 日目に、 T 細胞増殖応答を、以下の条件下で決定する： 2×10^4 T 細胞/ウェル；抗原提示細胞として 1×10^5 の照射した $PBMC$ /ウェル； $0.01 \mu g/ml \sim 10 \mu g/ml$ の最終濃度で変動するペプチド濃度。 T 細胞の増殖を、 3H チミジン ($1 \mu Ci$ /ウェル) の添加によって 3 日後に、その細胞の採集前 18 時間にて測定した。細胞を、ガラスフィルター上にて採取し、そして 3H -チミジン取り込みを、 β プレートカウンターにおいて測定した。これらの結果は、 3H -チミジン取り込みを測定することによる T ヘルパー細胞活性をアッセイするための方法を実証する。

【0176】

(実施例 III：細胞傷害性 T リンパ球応答についてのアッセイ)

本実施例は、細胞傷害性 T リンパ球 (CTL) 活性をアッセイするための方法を示す。 CTL 応答を、本質的に以前に記載されるように測定する (Vittie l l o ら、Eur. J Immunol. $27:671-678$ (1997)、これは、本明細書において参考として援用される)。手短には、 DNA 免疫の約 $10-35$ 日後に、動物から脾細胞を単離し、そして $37^\circ C$ で同系の照射した (3000 ラド) ペプチドコーティングした LPS 芽細胞 ($1 \times 10^6 \sim 1.5 \times 10^6$ 細胞/ ml) と、 $T25$ フラスコ中の $10 ml$ の $R10$ 中で同時培養した。 LPS 芽細胞を、 $37^\circ C$ で 3 日間 $T75$ フラスコ中の $30 ml$ の $R10$ 培地中の $25 \mu g/ml$ のリボポリサッカライド (LPS) (Sigma cat. no. $L-2387$; St. Louis, MO) および $7 \mu g/ml$ のデキストラン硫酸 (Pharmacia Biotech) を用いて脾細胞 ($1 \times 10^6 \sim 1.5 \times 10^6$ 細胞/ ml) を活性化することによって得る。次いで、リンパ芽球を、 $2.5 \times 10^7 \sim 3.0 \times 10^7/ml$ の濃度で再懸濁し、照射し (3000 ラド)、そして適切なペプチド ($100 pg/ml$) を用いて $37^\circ C$ で 1 時間コーティングする。細胞を、一回洗浄し、所望の濃度にて $R10$ 培地中に再懸濁し、そしてレスポンド細胞調製物に添加する。培養物を、 ^{51}Cr 放出アッセイにおいて 7 日目に細胞変性活性についてアッセイする。

【0177】

^{51}Cr -放出アッセイについて、標的細胞を、90分間37℃にて150 μl のナトリウム ^{51}Cr クロメート (^{51}Cr) (New England Nuclear; Wilmington DE) を用いて標識し、3回洗浄し、そして適切な濃度でR10培地中に再懸濁する。アッセイについて、 10^4 の標的細胞を、そのペプチドの10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ の存在下または非存在下でU底96ウェルプレート中の最終容量200 μl 中の異なる濃度のエフェクター細胞の存在下でインキュベートする。上清を37℃6時間後に除去し、そして特異的な溶解のパーセントを、以下の公式によって決定する：特異的な溶解のパーセント = $100 \times (\text{実験上の放出} - \text{自然放出}) \cdot (\text{最大放出} - \text{自然放出})$ 。異なる実験からの応答の比較を容易にするために、パーセント放出データを、 10^6 細胞あたり溶解ユニット30に変形する ($\text{LU}30/10^6$)。ここで、1LU30は、6時間アッセイにおいて 10^4 標的細胞の30%溶解を誘発するために必要とされるエフェクター細胞の数と定義される。LU値は、(ペプチドの存在下で得られたLU30/ 10^6) - (ペプチドの非存在下で得られたLU30/ 10^6)で表される。これらの結果は、細胞からの ^{51}Cr 放出を測定することによってCTL活性をアッセイするための方法を実証する。

【0178】

(実施例IV：MHCクラスIIエピトープをコードする発現ベクターおよびMHCクラスII標的化配列を用いて免疫されるマウスにおけるT細胞増殖)

本実施例は、MHCクラスIIエピトープをコードする発現ベクターおよびMHCクラスII標的化配列がT細胞を活性化するに有効であることを実証する。

【0179】

T細胞増殖アッセイにおいて使用される構築物は、実施例Iに記載され、そしてCMV駆動発現ベクターであるベクターpEP2中にクローニングされた。インビトロでのT細胞刺激に使用されるペプチドは、以下である：Ova323-339、ISQAVHAHAHA EINEAGR (配列番号123)；HBVcore128、TPPAYRPPNAPILF (配列番号124)；HBVenv182、FFLLTRILTI PQSLD (配列番号125)；およびPADR

E、AKFVAAWTLKAAA（配列番号38）。

【0180】

T細胞増殖を、本質的に実施例IIに記載されるようにアッセイした。手短には、12～16週齢のB6D2 F1マウス（1構築物あたり2マウス）に、100 μ gの指定された発現ベクター（1脚あたり50 μ g）を、前脛骨筋中に注射した。11日後、脾臓をそのマウスから収集し、そしてDounce均質化によって単細胞懸濁物へと分離した。脾細胞を計数し、そして100万の脾細胞を、96ウェルプレート中の1ウェルあたりにプレートした。各サンプルを三連で行った。それぞれの発現ベクターによってコードされる10 μ g/mlの対応するペプチドを各ウェルに添加した。1ウェルは、ネガティブコントロールのために添加されたペプチドなしの脾細胞を含んだ。細胞を、3日間、37℃で5% CO₂中にて培養した。

【0181】

3日後、1 μ Ciの³H-チミジンを、各ウェルに添加した。37℃で18時間後、その細胞を、ガラスフィルター上にて採取し、そして³H取り込みを、LKB β プレートカウンターにて測定した。T細胞増殖アッセイの結果を表9に示す。抗原特異的T細胞増殖を、刺激指数（SI）として示す；これは、抗原の非存在下での³H-チミジン取り込みで除した、抗原の存在下での平均の³H-チミジン取り込みの比と定義する。

【0182】

免疫原「PADRE+IFA」は、不完全フロイントアジュバントにおけるそのPADREペプチドがそのマウスに注射され、そしてPADRE配列を含むMHCクラスIIエピトープ構築物を注射する場合に見られる応答と比較される場合のポジティブコントロールである。表9に示すように、試験した発現ベクターの殆どは、PADREペプチドの添加に応答してT細胞増殖を活性化するにおいて有効であった。発現ベクターのいくつかの活性は、不完全フロイントアジュバント中のPADREペプチドを用いた免疫において見られるものと同等であった。MHCクラスIおよびMHCクラスIIの両方のエピトープを含む発現ベクターであるpEP2-AOSおよびpcDNA-AOSもまた、PADREペプチ

ドの添加に応答してT細胞増殖を活性化するにおいて有効であった。

【0183】

これらの結果は、MHCクラスII標的化配列に対して融合されたMHCクラスIIのエピトープをコードする発現ベクターがT細胞増殖を活性化するにおいて有効であり、そして免疫応答を刺激するために有用であることを示す。

【0184】

(実施例V：トランスジェニックマウスを使用するインビボアッセイ)

(A. 材料および方法)

ペプチドを、以前に記載された標準的なFmoc固相合成法(Ruppertら、Cell 74:929(1993); Setteら、Mol. Immunol. 31:813(1994))に従って、合成した。ペプチドの純度を、分析用逆相HPLCによって決定し、そして純度は、日常的に95%を超えた。Theradigm-HBVリポペプチドワクチンの合成および精製は、(Vitellioら、J. Clin. Invest. 95:341(1995))に記載されている。

【0185】

(マウス)

本研究において使用するHLA-A2.1トランスジェニックマウスは、SJL/Jマウス(Jackson Laboratory、Bar Harbor、ME)を用いて、HLA-A2.1の $\alpha 1$ 、 $\alpha 2$ ドメイン、およびH-2K^bの $\alpha 3$ ドメインからなるキメラ遺伝子を発現するトランスジェニックマウスを交雑することに由来する、F1世代であった。本明細書において、以下、この系統をHLA-A2.1/K^b-H-2^{bxs}という。この親HLA-A2.1/K^bトランスジェニック系統を、トランスジーンおよび(Vitellioら、J. Exp. Med. 173:1007(1991))に記載される方法を使用して、C57BL/6バックグラウンドにおいて生成した。本研究において使用するHLA-A11/K^bトランスジェニックマウスは、(Alexanderら、J. Immunol. 159:4753(1997))に記載されるトランスジェニックマウスと同一であった。

【0186】

(細胞株、MHC精製およびペプチド結合アッセイ)

ペプチド特異的細胞傷害性アッセイのための標的細胞は、HLA-A2.1/K^bキメラ遺伝子を用いてトランスフェクトしたJurkat細胞(Vittieら、J. Exp. Med. 173:1007(1991))、およびHLA-A11/K^bを用いてトランスフェクトした221腫瘍細胞(Alexanderら、J. Immunol. 159:4753(1997))であった。

【0187】

内在的にプロセスされたエピトープの提示を測定するために、Jurkat A2.1/K^b細胞を、pMin.1またはpMin.2-GFPミニ遺伝子を用いてトランスフェクトし、次にエピトープ特異的CTL株に対する細胞傷害性アッセイにおいて試験した。トランスフェクションのために、Jurkat A2.1/K^b細胞を 10^7 細胞/mlで再懸濁し、そして30 μ gのDNAを600 μ lの細胞懸濁液に添加した。細胞を、0.4cmキューベット中で、0.25kV、960 μ Fdでエレクトロポレーションした後、細胞を氷上で10分間インキュベートし、次にRPMI培養培地中で2日間培養した。次に細胞を200U/mlのハイグロマイシンB(Calbiochem、San Diego CA)を含有する培地中で培養し、安定なトランスフェクタントを選択した。FACSを使用して、グリーン蛍光タンパク質(GFP)発現細胞の画分を、15%~60%に富化した(データ示さず)。

【0188】

精製したHLA-A2.1および-A11分子に対するペプチドの結合を定量的に測定する方法は、Ruppertら、Cell 74:929(1993); Setteら、Mol. Immunol. 31:813(1994); Alexanderら、J. Immunol. 159:4753(1997)に記載される。

【0189】

全ての腫瘍細胞株および初回刺激したマウス由来の脾臓CTLを、10% FBS、4mM L-グルタミン、 5×10^{-5} M 2-ME、0.5mM ビルビ

ン酸ナトリウム、 $100\mu\text{g}/\text{ml}$ ストレプトマイシン、および $100\text{U}/\text{ml}$ ペニシリンを補充したHepes (Life Technologies、Grand Island、NY) を有するRPMI 1640培地からなる培養培地 (CM) 中で増殖させた。

【0190】

(ミニ遺伝子マルチエピトープDNAプラスミドの構築)

pMIN. 0およびpMIN. 1 (すなわち、pMIN-AOS) を、上記のように、および米国特許出願第60/085, 751号に記載のように、構築した。

【0191】

(pMin. 1-No PADREおよびpMin. 1-Anchor)

pMin. 1を2つの重複するフラグメントを使用して増幅し、次にこれを組み合わせて、全長産物を生じた。第1の反応は、5' pcDNAベクタープライマーT7、およびpMin. 1-No PADREについて

【0192】

【化1】

ATCGCTAGGCAGGAACTTATACAGGATTCC

【0193】

(配列番号126) またはpMin. 1-Anchorについて

【0194】

【化2】

TGGACAGTCCGGCTCCCAGCACCCACGT

【0195】

(配列番号127) のいずれかを使用した。3' 半分を、プライマー

【0196】

【化3】

TTCCTGCCTAGCGATTTC

【0197】

(配列番号128) (No PADRE) または

【0198】

【化4】

GCTGGGAGCCGGA CTGTCCAGGTACGT

【0199】

(配列番号129) (Anchor)、およびMin-StopRを用いて増幅した。5' および3' 末端の増幅より生成される2つのフラグメントを、ゲル精製し、混合し、変性し、アニールし、そして5サイクルのPCRを用いて充填 (fill in) した。全長フラグメントを、隣接するプライマーT7およびプライマーMin-StopRを用いて25より多いサイクルで、さらに増幅した。

【0200】

(pMin. 1-No Sig.)

I gシグナル配列を、pMin. 1から、プライマー

【0201】

【化5】

GCTAGCGCCGCCACCATGCACACCCTGTGGAAGGCCGGAATC

【0202】

(配列番号130)、およびpcDNArev (Invitrogen) プライマーを用いるPCR増幅によって欠失した。この産物をPCR-blunt中にクローニングして、配列決定した。

【0203】

(pMin. 1-Switch)

3つの重複するフラグメントを、pMin. 1より増幅し、組み合わせ、そし

て伸長した。5' フラグメントをベクタープライマー T7、およびプライマー

【0204】

【化6】

GGGCACCAGCAGGCTCAGCCACACTCCCAGCACCACGTC

【0205】

(配列番号131)を用いて、増幅した。第2の重複するフラグメントを、プライマー

【0206】

【化7】

AGCCTGCTGGTGCCCTTTGTGATCCTGAAGGAGCCTGTGC

【0207】

(配列番号132)、およびプライマー

【0208】

【化8】

AGCCACGTACCTGGACAGTCCCTTCCACACAGGCACTCCAT

【0209】

(配列番号133)を用いて増幅した。プライマー

【0210】

【化9】

TGTCCAGGTACGTGGCTAGGCTGTGAGGTACC

【0211】

(配列番号134) およびベクタープライマー p cDNA rev (Invitrogen) を使用して、第3の (3') フラグメントを増幅した。フラグメント1、2、および3を増幅して、ゲル精製した。フラグメント2および3を混合し、アニールし、増幅し、そしてゲル精製した。フラグメント1を産物2および3

と組み合わせ、そして伸長し、ゲル精製し、そしてp c D N A 3. 1中に発現のためにクローニングした。

【0212】

(pM i n. 2-G F P)

シグナル配列を、pM i n. 0から、M i n. 0-No S i g-5' およびp c D N A r e v (I n v i t r o g e n) プライマー

【0213】

【化10】

GCTAGCGCCGCCACCATGCACACCCTGTGGAAGGCCGGAATC

【0214】

(配列番号135)を用いるP C R増幅によって欠失した。この産物をp C R-b l u n t中にクローニングして、配列決定した。シグナル配列を欠失するマルチエピトープ構築物のオープンリーディングフレームを含有する挿入物を、N h e IおよびH i n d I I Iを用いて切り出し、p E G F P N 1 (C l o n t e c h)の同一の部位中へ連結した。この構築物は、シグナル欠失pM i n. 0構築物のコード領域を、グリーン蛍光タンパク質(G F P)のN末端に融合する。

【0215】

(マウスの免疫)

DNA免疫のために、マウスを、50 μ lの10 μ M カルジオトキシン(c a r d i o t o x i n) (S i g m a C h e m. C o.、第C9759番)を、前脛骨筋中に、両側に注射することにより、前処理した。4~5日後、P B Sで希釈した100 μ gのDNAを、同一の筋肉中に注射した。

【0216】

-20℃で保存したT h e r a d i g m-H B Vリポペプチド(D M S O中に10mg/ml)を、45℃で10分間解凍し、次に室温のP B Sで1:10(容量/容量)で希釈した。P B Sの添加直後、リポペプチド懸濁液を強くボルテックスし、そして100 μ lを尾の底部に皮下注射した(100 μ g/マウス)。

【0217】

個々のCTLエピトープの免疫原性を、 $I-A^b$ 拘束Th細胞を誘導するように作用する、HBVコア128～140ペプチド(TPPAYRPPNAPIL (配列番号124)、 $140\mu\text{g}/\text{マウス}$)とともに各CTLエピトープ($50\mu\text{g}/\text{マウス}$)を混合することにより、試験した。次に、ペプチドカクテルを、不完全フロイントアジュバント(Sigma Chem. Co.)中でエマルジョン化し、そして $100\mu\text{l}$ のペプチドエマルジョンを尾の底部に皮下注射した。

【0218】

(インビトロCTL培養および細胞傷害性アッセイ)

免疫の11～14日後、動物を屠殺し、そして脾細胞の単一細胞懸濁液を調製した。cDNAで初回刺激した動物由来の脾細胞を、インビトロで、ミニ遺伝子中で示される各ペプチドエピトープを用いて刺激した。脾細胞($2.5\sim3.0\times10^7/\text{フラスコ}$)を、 $10\mu\text{g}/\text{ml}$ のペプチド、ならびにLPS($25\mu\text{g}/\text{ml}$)および硫酸デキストラン($7\mu\text{g}/\text{ml}$)で3日間活性化された、 10^7 の照射された脾臓細胞の存在下で、直立した 25cm^2 フラスコ中で培養した。3連の培養物を、各エピトープで刺激した。5日後、培養物に、新鮮なCMを供給した。インビトロ培養の10日後、各フラスコからの $2\sim4\times10^6$ CTLを、 $100\mu\text{g}/\text{ml}$ のペプチドで60～75分間 37°C で処理し、次に3500ラドで照射した、 10^7 LPS/硫酸デキストランで活性化した脾細胞で再刺激した。CTLを、8mlのサイトカインを含まないCM中の6mlウェルプレート中で、再刺激した。18時間後、培養物に、conA活性化脾細胞の上清中に含まれるサイトカインを添加し(10～15%最終濃度、容量/容量)、そして3日目に、10～15%サイトカイン上清を含有するCMを添加したか、または10～15%サイトカイン上清を含有するCMにおいて増殖させた。再刺激の5日後、各培養物のCTL活性を、ペプチドの存在下および非存在下において、 10^4 ^{51}Cr 標識された標的細胞とともに異なる数のCTLをインキュベートすることによって、測定した。NK細胞からの非特異的な細胞傷害性を減少させるために、YAC-1細胞(ATCC)もまた、20:1の比のYAC-1: ^{51}C

r 標識された標的細胞で添加した。HBV P o 1 5 5 1 エピトープに対するCTL活性を、DNAで初回刺激された脾細胞をネイティブのA含有ペプチドでインビトロ刺激し、そして同一のペプチドに対する細胞傷害性活性について試験することにより、測定した。

【0219】

応答をより容易に比較するために、標準E:T比に対する%細胞傷害性データカーブを、1 LUを100:1のE:T比で30%の標的細胞の溶解を達成するのに必要とされる溶解活性として定義し、 10^6 エフェクター細胞あたりのLUに変換した。比CTL活性(Δ LU)を、ペプチドを用いて得られたLU値から、ペプチドの非存在下で得られたLU値を減算することによって、計算した。以下の判定基準の全てが満たされる場合、所与の培養物を、CTL誘導について陽性であるとしてスコアした: 1) Δ LU > 2; 2) LU(+ペプチド) ÷ LU(-ペプチド) > 3; および 3) 2つの最高のE:T比において、ペプチドの有無において試験した%細胞傷害性における10%を超える差異(開始E:T比は、慣用的に25~50:1であった)。

【0220】

7日間の刺激期間の間に必要な場合、CTLがサイトカイン含有CMにおいて増殖されたことを除いて、上記のように、6ウェル培養条件を使用して、ペプチド処理LPS/D_xS活性化脾細胞を用いる毎週の反復するCTL刺激を介して、CTL株を、pMin. 1で初回刺激された脾細胞から生成した。

【0221】

(サイトカインアッセイ)

ミニ遺伝子でトランスフェクトされた標的細胞に応答するIFN- γ 産生を測定するために、 4×10^4 CTLを、96ウェルの平底プレート中で、等価の数のミニ遺伝子でトランスフェクトされたJurkat A2.1K^b細胞とともに、培養した。37での一晚のインキュベーションの後、各ウェルからの培養上清を収集し、そしてサンドイッチELISAを用いてIFN- γ 濃度についてアッセイした。Immulon IIマイクロタイターウェル(Dynatech、Boston、MA)を0.2 μ gの抗マウスIFN- γ 捕獲AbであるR4

－6A2 (Pharmingen) を用いて、4℃で一晩コートした。ウェルをPBS/0.1% Tween-20で洗浄し、そして1% BSAでブロッキングした後、A b－コートしたウェルを、室温で2時間、培養上清サンプルとともにインキュベートした。2次抗IFN- γ AbであるXMG1.2 (Pharmingen) を、ウェルに添加し、そして室温で2時間インキュベートさせた。次にウェルをアビジン-DHとともにインキュベーションし、最後にビオチン化西洋わさびペルオキシダーゼH (Vectastain ABCキット、Vector Labs、Burlingame、CA) およびTMBペルオキシダーゼ基質 (Kirkegaard and Perry Labs、Gaithersburg、MD) と共にインキュベーションして、発色させた。各サンプル中に存在するサイトカインの量を、rIFN- γ 標準 (Pharmingen) を使用して計算した。

【0222】

(b. 結果)

(エピトープの選択およびミニ遺伝子構築物の設計)

最初の一連の実験において、平衡化した多重特異性のCTL応答が、いくつかの優性のHLAクラスI－拘束エピトープをコードする単純なミニ遺伝子cDNA構築物によって誘導され得るか否かが、問題であった。従って、ヒトにおけるHBVおよびHIV感染の間のCTL免疫におけるその関連性、ウイルスサブタイプにおけるその配列保存性、およびそのクラスI MHC結合親和性(表10)に基づいて、9つのCTLエピトープを選択した。これらの9つのエピトープのうち、6つは、HLA-A2.1によって拘束され、そして3つは、HLA-A11－拘束を示した。1つのエピトープHBV Pol551を、2つの異なる形態において研究した：野生型配列またはより高度の結合親和性のために操作されたアナログ(HBV Pol551-V)のいずれか。

【0223】

表10において参照されるように、いくつかの独立した研究室が、これらのエピトープが、HBVまたはHIV感染の間の、優性CTL応答の一部であることを報告した。このエピトープの全てが、異なるHBVサブタイプおよびHIVク

リード中の一次アミノ酸配列において、75%を超える保存性を示した。ペプチドのMHC結合親和性もまた、エピトープの選択において考慮した。これらの実験は、広範囲の親和性を有するエピトープを用いる免疫の可能性を扱い、そして表10に示すように、6つのHBVエピトープおよび3つのHIV HLA-拘束エピトープが、3 nM~200 nMの範囲のIC₅₀%濃度を有して、2オーダーの範囲にわたるMHC結合親和性のスペクトルを網羅する。

【0224】

トランスジェニックマウス中の6つのA2.1-拘束CTLエピトープおよび3つのA1.1-拘束CTLエピトープの免疫原性を、IFA処方物中のヘルパーT細胞ペプチドを用いる同時免疫によって、確認した。エピトープの全ては、5~73 ΔLU範囲において有意なCTL応答を誘導した(表10)。上記のように、HBV Po1551のMHC結合および免疫原性を改善するために、このエピトープのC末端A残基を、Vで置換し、HLA-A2.1に対する結合親和性の劇的な40倍の増加を生じた(表10)。親配列は、HLAトランスジェニックマウスにおいて、弱い免疫原性であるか、または非免疫原性であったが、HBV Po1551-Vアナログは、IFA中で投与された場合、CTL活性の有意なレベルを誘導した(表10)。これらの結果に基づき、HBV Po1551エピトープのVアナログを、初期のミニ遺伝子構築物のために選択した。本明細書において報告される全ての実験において、CTL応答を、免疫においてVアナログを使用したか、またはネイティブエピトープを使用したかにかかわらず、ネイティブHBV Po1551エピトープでコートした標的細胞を用いて測定した。

【0225】

最後に以前の研究は、T細胞補助の誘導が、CTL応答の大きさおよび持続を有意に改善したことを示した(Vitielloら、J. Clin. Invest. 95:341(1995); Livingstonら、J. Immunol. 159:1383(1997))ので、ユニバーサルTh細胞エピトープPADREもまた、ミニ遺伝子中に導入した。PADREは、広範のマウスおよびヒトMHCクラスIIハプロタイプに対して高いMHC結合親和性を有することが

以前に示されている (Alexanderら、Immunity 1:751 (1994))。特に、PADREが、本研究において使用するH-2^bマウスにおいて、高度に免疫原性であることが、以前に示されている (Alexanderら、Immunity 1:751 (1994))。

【0226】

9つのCTLエピトープおよびPADREをコードするプロトタイプのcDNAミニ遺伝子構築物であるpMin. 1を合成して、pcDNA3.1ベクター中にサブクローニングした。ミニ遺伝子中の9つのエピトープの各々の位置は、結合部でのマウスH-2^bおよびHLA-A2.1クラスI MHCエピトープを避けるように、最適化された。マウスIg κ シグナル配列もまた、構築物の5'末端に含め、他者 (Andersonら、J. Exp. Med. 174:489 (1991)) によって報告されたように、小胞体 (ER) 中でのCTLエピトープのプロセッシングを促進した。CTLエピトープのプロセッシングに影響し得る、翻訳されたポリペプチド遺伝子産物における、さらなるコンフォメーションな構造をさけるために、ATG終止コドン、pcDNA3.1ベクター中のc-mycおよびポリhisエピトープのコード領域の上流の、ミニ遺伝子構築物の3'末端に、導入した。

【0227】

(トランスジェニックマウスにおけるpMin. 1の免疫原性)

pMin. 1ミニ遺伝子構築物がインビボにおいてCTLを誘導する能力を評価するために、HLA-A2.1/K^b-H-2^{bxs}トランスジェニックマウスを、100 μ gの裸のcDNAを用いて、筋肉内に免疫した。cDNA免疫によるCTLの誘導のレベルを比較する手段として、動物のコントロール群もまた、Theradigm-HBV (破傷風毒素830~843Th細胞エピトープと連結したHBVコア18CTLエピトープからなるパルミトイル化 (palmitoylated) リポペプチド) で免疫した。

【0228】

免疫した動物由来の脾細胞を、ミニ遺伝子中のコードされる各ペプチドエピトープを用いて、2回刺激し、次に、⁵¹Cr放出アッセイにおいて、ペプチド特異

的細胞傷害性活性についてアッセイした。図22に示す、pMin. 1で初回刺激した脾細胞のCTL応答の代表的なパネルは、CTL誘導の有意なレベルがミニ遺伝子免疫によって生成されることを明確に示す。ことなるエピトープで刺激された培養物の大多数において、標的細胞の特異的溶解は、1:1でのE:Tの比において、50%を超えた。表11にまとめた、4つの独立した実験の結果は、pMin. 1構築物が、HLA-A2.1/K^b-H-2^{b*5}トランスジェニックマウスにおいて、実際に高度に免疫原性であり、その6つのA2.1-拘束エピトープの各々に対して指向する広範なCTL応答を誘導することを示す。

【0229】

異なるエピトープにおいて、CTL誘導のレベルをより容易に比較するために、各脾細胞培養物についての%細胞傷害性の値を、ΔLUに変換し、そして各エピトープについての陽性培養物におけるCTL活性の平均ΔLUを測定した（実施例V、材料および方法、陽性判定基準について参照のこと）。この様式において表11に示されたデータは、pMin. 1免疫によって誘発されるCTL誘導の大きさを確認する。なぜなら、50~700の間のΔLUの範囲の非常に高いCTL応答が、6つのA2.1-拘束エピトープに対して観察されたからである。より顕著なことに、6つのエピトープの内の5つについて観察された数百のΔLU応答は、その高度なCTL誘導効力について公知であるワクチン処方物である、Theradigm-HBVリボペプチドの応答に近づくか、またはこれを超える（Vitielloら、J. Clin. Invest. 95:341（1995）；Livingstonら、J. Immunol. 159:1383（1997））。HBV Env335エピトープは、リボペプチドと比較して、より低い平均ΔLU応答を示す唯一のエピトープであった（表11、44対349ΔLU）。

【0230】

（トランスフェクトした細胞によるミニ遺伝子エピトープのプロセッシング）

HBV Env335に対して観察された、減少したCTL応答は、ある程度予測されないものであった。なぜなら、このエピトープは、良好なA2.1結合親和性（IC50%、5nM）を有し、そしてまた、IFA中で投与された場合

に免疫原性であったからである。より低い応答は、少なくとも部分的に、インビボでのcDNA免疫後の、抗原提示細胞によるミニ遺伝子ポリペプチドからのこのエピトープの不十分なプロセッシングに起因し得る。この問題に対処するために、Jurkat A2.1K^b腫瘍細胞を、pMin.1 cDNAでトランスフェクトし、そしてトランスフェクトした細胞によるHBV Env335エピトープの提示を、特異的なCTL株を使用してより免疫原性のA2.1-拘束エピトープと比較した。エピトープの提示もまた、コントロールcDNA構築物であるpMin.2-GFP（トランスフェクトした細胞中のミニ遺伝子発現を、FACSによって検出することを可能にするGFPと融合された、類似のマルチエピトープミニ遺伝子をコードする）でトランスフェクトした腫瘍細胞を使用して研究した。

【0231】

トランスフェクトされたJurkat細胞のエピトープ提示を、特定のCTL株（これは、読み出し（read-out）として役に立つ細胞傷害性またはIFN- γ 産生を有する）を用いて分析した。CTL応答のレベルは、エピトープのインビボでの免疫原性と直接相関することが、見出された。インビボでの高い免疫原性エピトープ（例えば、HBV Core18、HIV Pol476、およびHBV Pol455）は、IFN- γ 産生（図23A、各エピトープについて、 $>100\text{ pg/ml}$ ）または細胞傷害性活性（図23C、 $>30\%$ 特異的溶解）により測定されるように、pMin.1-GFPトランスフェクト細胞またはpMin.2-GFPトランスフェクト細胞によりCTL株に効率的に提示された。これらのインビボでの高い活性とは対照的に、HBV Env335特異的CTL株の、両方のトランスフェクトされた細胞の集団に対する刺激は、 12 pg/ml 未満のIFN- γ および 3% 未満の特異的溶解を生じた。HBV Env335特異的CTL株は、天然に処理されたエピトープを効率的に認識しなかったが、この株は、他のエピトープに対して特異的なCTL株と比較して、ペプチドロードした標的細胞に対して、同等の応答を示した（図23B、D）。まとめると、これらの結果は、プロセッシングおよび／または提示の欠損が、インビボでの免疫原性の減退に起因し得るHBV Env335エピトープと関連

することを示唆する。

【0232】

(ミニ遺伝子免疫原性に対するヘルパーT細胞エピトープPADREの効果)

複数のHLA-A2.1拘束エピトープをコードするミニ遺伝子cDNAで免疫されたトランスジェニックマウスにおける広範にかつ平衡したCTL応答が得られたために、原型構築物の免疫原性に影響を与え得る、次の可能な変数を調べた。この型の分析は、さらなる(future)構築物の合理的かつ迅速な最適化をもたらした。さらに詳細には、ミニ遺伝子の免疫原性においてT細胞補助の分布を試験するためにPADREエピトープを欠失した、pMin.1原型に基づくcDNA構築物を合成した。

【0233】

免疫原性分析の結果は、PADRE Th細胞エピトープの欠失が、原型pMin.1構築物で免疫された動物における90～100%の頻度と比較して、これらのエピトープに対して観察された17～50%のCTL陽性培養物が示すように、4つのミニ遺伝子エピトープ(HBV Core18、HIV Env120、HBV Pol455、およびHBV Env335)に対する特異的CTL前駆体の頻度の有意な減少を生じることを示した(図25)。さらに、それらのエピトープのうち2つ(HBV Core18およびHIV Env120)について、pMin.1-No PADREによって誘導された陽性培養物における応答の規模は、pMin.1構築物の応答規模の20分の1～30分の1未満であった(図25A)。

【0234】

(エピトープ免疫原性に対するMHC結合親和性の調節の効果)

次に、エピトープ免疫原性に対するMHC結合の減少効果を定める(address)ために、HBV Pol551におけるVアンカー残基をネイティブな残基であるアラニンと置換した、構築物を合成した(図24B)。

【0235】

Th細胞エピトープの欠失とは異なり、アンカー残基の修飾による、HBV Pol551エピトープのMHC結合能力の40倍の減少は、エピトープ免疫原

性に影響を及ぼすようではなかった（図25B）。CTL陽性培養物のLUまたは頻度のいずれかにより測定される、HBV Pol 551 エピトープおよび他のエピトープに対するCTL応答は、MHC結合アンカー部位にネイティブAまたは改良されたV残基を含む構築物間で非常に類似していた。この知見は、最小のエピトープミニ遺伝子は、非常に異なるMHC結合親和性のエピトープを効率的に送達し得る概念を強化する。さらに、この知見は、異なる送達方法を介したエピトープ免疫原性の増強に、野生型HBV Pol 551 エピトープは、強力でないIFAエマルジョン中で送達された場合、本質的に非免疫原性であったという事実の観点から、特に関連する。

【0236】

（シグナル配列のミニ遺伝子構築物の免疫原性に対する効果）

シグナル配列を、pMin. 1構築物から欠失させ、このことによってERにおけるミニ遺伝子ポリペプチドのプロセッシングを妨害した（図24C）。pMin. 1-No Sig構築物の免疫原性を試験した場合、応答の全体的な減少が、4つのCTLエピトープに対して見出された。これらのエピトープのうちの2つ（HIV Env 120およびHBV Env 335）は、pMin. 1と比較してCTL陽性培養物の頻度の減少を示したが、残りのエピトープ（HBV Pol 455およびHIV Pol 476）は、それぞれ、平均CTL応答の大きさにおいて16倍減少（424から27ΔLUまで）および3倍減少（709から236ΔLUまで）を示した（図25C）。これらの知見は、pMin. 1プロトタイプ構築物においてコードされたいくつかのエピトープのERプロセッシングを可能にすることが、エピトープの同じパネルの細胞質プロセッシングのみを可能にする構築物と比較して、免疫原性を改善し得ることを示唆する。

【0237】

（エピトープ再配置の効果および新たな接合エピトープの作製）

試験した最終構築物において、HBV Env 335 エピトープの免疫原性を分析して、このエピトープがミニ遺伝子構築物の3'末端でのその位置により影響が及ぼされるか否かを決定した（図24D）。例えば、cDNA構築物のEnv エピトープの部分は、ミニ遺伝子の中央に位置した、より免疫原性のエピト

ープであるHBV Pol 455と切り換えられる。この改変はまた、2つの潜在的に新たなエピトープを作製したことに注意すべきである。図25Dに示されるように、この2つのエピトープの転移は、転移したエピトープのみならず、より全体的に他のエピトープの免疫原性に影響を及ぼすようである。エピトープの切り換えによって、HBV Env 335 に対するCTL誘導の消失を生じた（6つから検出された陽性培養物はなかった）。末端HBV Pol 455 エピトープにより誘導されたCTL応答はまた、減少したが、わずかであった（78に対して424の平均ΔLU）。切り換えられたエピトープに加えて、pMin. 1-Switch構築物における他のエピトープに対するCTL誘導はまた、プロトタイプ構築物と比較して顕著に減少した。例えば、CTL応答はHIV Env 120 エピトープに対しては観察されず、そしてHBV Core 18 エピトープ（6つの陽性培養物のうち4つ、306から52まで平均ΔLUが減少）およびHBV Pol 476 エピトープ（709から20まで平均ΔLUが減少）に対して、有意に減少した（図25D）。

【0238】

前述のように、2つのエピトープを切り換えることにより、新たな接合エピトープが作製されたことに注意すべきである。事実、pMin. 1-Switch構築物において、2つの新たな潜在的CTLエピトープが、HBV Env 335-HIV Pol 476 エピトープ（LLVPFVIL（配列番号135）、H-2K^b拘束されている）およびHBV Env 335-HBV Pol 1551 エピトープ（VLGVWLSLLV（配列番号136）、HLA-A2.1拘束されている）の配列から作製された。これらの接合エピトープは、これらが実際に免疫原性であるか否かを決定するために試験されていないが、このことは、HBV Env 335 エピトープおよびHIV Pol 476 エピトープの低い免疫原性を説明し得る。これらの知見は、接合エピトープを避けることが、HLAトランスジェニックマウスのようなインビボでの生物学的アッセイ系においてそれらの免疫原性を確認する能力であるために、マルチエピトープミニ遺伝子を設計することにおいて重要であることを示唆する。

【0239】

(pMin. 1においてコードされたA11エピトープに対するCTLの誘導)

複数のエピトープに対するのみならず、異なるHLA対立遺伝子により拘束されるエピトープに対しても広範なCTL応答を誘導するためのミニ遺伝子ワクチンアプローチの柔軟性をさらに試験するため、pMin. 1構築物における3つのA11エピトープがCTLについて免疫原性であるか否かを決定するために、同じ構築物におけるA2.1拘束エピトープについての場合と同様に、HLA-A11/K^bトランスジェニックマウスを免疫した。表12にまとめられるように、有意なCTL誘導は、全3つのHLA-A11拘束されたエピトープおよび3つのエピトープについて誘導されたCTL免疫のレベル(40~260 ΔLUの範囲において)(これは、IFAにおいて送達されたペプチドのレベルを超える)に対して大部分の培養物で観察された(表10)。従って、種々のHLA拘束の9つのCTLエピトープは、インビボで全て有意なCTL誘導を実証したプロトタイプミニ遺伝子構築物に組み込まれ、このことによって、ミニ遺伝子DNAのプラスミドが、複数エピトープを送達し、HLA拘束およびMHC結合親和性を変化させる手段として免疫原性様式で免疫系に対して作用し得、そして適切なトランスジェニックマウス系統は、インビボでDNA構築物の免疫原性を測定するために使用され得ることが確認される。

【0240】

CTLはまた、A11/K^bトランスジェニックマウスの3つのA11エピトープに対して誘導された。これらの応答は、広範な集団適用範囲を付与する、複数のCTLエピトープのミニ遺伝子送達がヒトにおいて可能であり得ること、および適切なハプロタイプのトランスジェニック動物がミニ遺伝子DNAのインビボでの免疫原性を最適化するに有用なツールであり得ることを示唆する。さらに、動物(例えば、ヒトMHC分子によって認識されるCTLおよびHLAのエピトープに対する交差反応性を有する、保存されたHLA分子を有するサル)を使用して、CTLおよびCTLのエピトープのヒト免疫原性を決定し得る(Bertoniら、J. Immunol. 161:4447-4455(1998))。

【0241】

この研究によって、ヒトHLA抗原によって拘束されたエピトープに対する応答を試験することによる、DNAワクチンのインビボでの免疫原性を定量するためにHLAトランスジェニックマウスを使用することの最初の記載が示される。インビボでの研究は、インビトロアッセイでは容易には評価されないワクチン開発に非常に重要な変数（例えば、投与経路、ワクチン処方物、組織の生体分布、ならびに1次および2次リンパ器官の関連性（*involvement*））を扱うために必要とされる。その簡便性および柔軟性のために、HLAトランスジェニックマウスは、少なくとも初期のワクチン開発研究のために、高等動物種（例えば、非ヒト霊長類）でのより煩わしく、かつ高価な研究と比較して、魅力的な代替物である。上記のインビトロ提示研究は、インビボでの免疫原性とインビトロでの提示との間に直接的な相関が観察される限りは、ヒトエピトープを含むDNA構築物をスクリーニングするためのHLAトランスジェニックマウスの使用をさらに支持する。最後に、強力なCTL応答が全6つのA2.1拘束されたウイルスエピトープに対して、そしてプロトタイプpMin.1構築物においてコードされた3つのA1.1拘束されたエピトープにおいて観察された。5つのA2.1拘束されたエピトープについては、CTL応答の大きさは、リポペプチド、Theradigm-HBV（ヒトにおいて強力なCTL応答を誘導することが以前示された）で観察された大きさに近かった（Vitielloら、J. Clin. Invest. 95:341（1995）；Livingstonら、J. Immunol. 159:1383（1997））。

【0242】

【表1】

表1 HBV由来のHTLエピトープ

ペプチド	配列	供給源	配列番号
1298.06	KQAFTEFTYKAFLC	HBV POL 661	
F107.03	LQSLTNLSSNLWL	HBV POL 412	
1280.06	AGFELLTRLTIPQS	HBV ENV 180	
1280.09	GTSFVYVPSALNPAD	HBV POL 774	
CF-08	VSGVWIRTPPAYRPPNAPI	HBV NUC 120	
27.0280	GVVWIRTPPAYRPPNA	HBV NUC 123	
1186.25	SRGVWIRTPPAYRPP	HBV NUC 121	
27.0281	RHYLHTLWKAGILYK	HBV POL 145	
F107.04	PFLAQFTSAICSVV	HBV POL 523	
1186.15	LVPFVQWFVGLSTV	HBV ENV 339	
1280.15	LHLYSHPIILGFRKI	HBV POL 501	
1298.04	KQCFRKL PVNRPIDW	HBV POL 615	
1298.07	AANWILRGTSFYVVP	HBV POL 764	
857.02	PIIHTALRQAILCWGELMTLA	HBV CORE 50	
35.0100	LCQVFADATPTGWGI	HBV POL 683	
35.0096	ESRLVVDFSQFSRGN	HBV POL 387	
35.0093	VGPLTVNEKRRLKLI	HBV POL 96	
1186.18	NLSWLSLDVSAATYH	HBV POL 422	

【0243】

【表2】

表2 HBV由来のCTLエピトープ

スーパータイプ	ペプチド	配列	供給源	配列番号
A2	924.07	FLPSDFPSV	HBV core 18-27	
	1013.0102	WLSTLVPPV	HBVadr-ENV (S Ag 335-343)	
	777.03	FLITRILIT	HBV ENV aYW 183	
	927.15	ALMPLYACH	HBV aYW pol 642	
	1168.02	GLSRYVARL	HBV POL 455	
A3	927.11	FLSLGHIL	HBV pol 562	
	1147.16	HTLWKAGILYK	HBV POL 149	
	1083.01	STLPETTIVRR	HBV core 141	
	1090.11	SAICSVVR	HBV pol 531	
	1090.10	QATFSPYTK	HBV pol 665	
	1069.16	NVSPWTHK	HBV pol 47	
	1069.20	LVVDFSQFSR	HBV pol 388	
	1142.05	KVGNFTGLY	HBV adr POL 629	
	1069.15	TLWKAGILYK	HBV pol 150	
	1145.04	IPSSWAF	HBV ENV 313	
B7	988.05	LPSDFPSV	HBV core 19-27	
	1147.04	TRARVTGGVF	HBV POL 354	
A2	1069.06	LLVPFVQWVF	HBV env 338-347	
	1147.13	FLAQFTSAI	HBV POL 513	
	1147.14	VLLDYQGMLPV	HBV ENV 259	
	1132.01	LVPFVQWVF	HBV ENV 339	
	1069.05	LIAQFTSAI	HBV pol 504-512	
	927.42	NI-SWLSIDV	HBV pol 411	
	927.41	LJSSNISWL	HBV pol 992	
	927.46	KLIHLYSHH	HBV pol 489	
	1069.071	FLAQFTSA	HBV pol 503	
	1142.07	GLLGWSIPA	HBV ENV 62	
	927.47	HLVSHHIL	HBV aYW pol 1076	
	1069.13	PLLPFFCL	HBV env 377-385	
	1013.1402	VLQAGFHLL	HBVadr-ENV 177	
	1090.14	YMDVVVIGA	HBV pol 538-546	
A3	26.0539	RLVVDIFSQFSR	HBV pol 376	
	26.0535	GVWIRTPAYR	HBV X nuc fus 299	

【0244】

表2 (続き) HBV由来のCTLエピトープ

スーパータイプ	ペプチド	配列	供給源	配列番号
A3	26.0153	SSAGFCALR	HBV X 64	
	1.0993	KVFLGGCR	HBV adr "X" 1548	
	26.0149	CALRTSAR	HBV X 69	
	26.0023	VSGVWIR	HBV x nuc fus 296	
	26.0345	TLTETTVRRIR	HBV x nuc fus 318	
	20.0131	SVVRAAFHI	HBV POL 524	
	1.0219	FVIAKCRIR	HBV adr "X" 1550	
	26.0008	FIFSPTYK	HBV pol 656	
	20.0130	AFTESPTYK	HBV POL 655	
	1147.05	FHCLAFSYM	HBV POL 530	
B7	1147.08	YPALMPLYA	HBV POL 640	
	1147.06	LPVCAFSSA	HBV X 58	
	1147.02	HPAAMPILL	HBV POL 429	
	26.0570	YPALMPLYACI	HBV pol 640	
	19.0014	YPALMPLY	HBV POL 640	
その他	1145.08	FHCLAFSY	HBV POL 541	
	1090.02	AYRPPNAIH	HBV NUC 131	
	1.0519	DLIDTASALY	HBV adr CORE 419	
	13.0129	EYLVSGVWI	HBV NUC 117	
	20.0254	FAAFTQCGY	HBV POL 631	
	2.0060	GYPALMPLY	HBV ALL 1224	
	1069.04	ITTLWKAGIHY	HBV pol 149	
	1069.08	ILLCLIFLL	HBV env 249-258	
	1.0166	KVGNFTGLY	HBV adr POL 629	
	1069.23	KYTSFPWLL	HBV POL 745	
	1069.01	LDITASALY	HBV core 59	
	2.0239	LSLIVSAAFY	HBV ALL 1000	
	2.0181	LYSHIPILGF	HBV POL 492	
	1039.01	MMWYWGPSLY	HBV 360	
	2.0126	MSTTDLEAY	HBV adr 1521	
	1069.03	PLDKGKIPYY	HBV pol 124	
	1090.09	PTTGRTSLY	HBV pol 808	
	20.0138	PWTHKVGNI	HBV POL 51	
	20.0135	RWMCLRRHI	HBV ENV 236	
	20.0269	RWMCLRRHI	HBV ENV 236	
	20.0139	SFGSPYSW	HBV POL 167	

表2 (続き) HBV由来のCTLエピトープ

スーパータイプ	ペプチド	配列	供給源	配列番号
その他	1069.02	SLDYSAAFY	HBV pol 427	
	20.0136	SWLSLLVPF	HBV ENV 334	
	20.0271	SWPKFAVPNL	HBV POL 392	
	20.0137	SWWTSNLFL	HBV ENV 197	
	2.0173	SYQHFRKILL	HBV POL 4	
	13.0073	WHHSCTTF	HBV N1C 102	
	1.0774	WLVGMDDIPY	HBV adw CORE 416	
	1039.06	WMMWYWGPSLY	HBV env 359	
	924.14	FLPSDFPFSI	HBV 18-27 I ₀ var. .	
	1090.77	YMDDVVLGV	HBV pol 538-546 sub	
	941.01	FLPSDYFPSV	HBV 18-27 3702	
	1083.02	STLPETYVVR	HBV core141-151 3702	
	1145.05	FPFSSWAF	HBV ENV 313 3702	
	1145.11	FPHCLAFSL	HBV POL 541 3702	
	1145.24	FPHCLAFAL	HBV POL 541 3702	
	1145.06	IPITSSWAF	HBV ENV 313 3702	
	1145.23	IPPMMSWAF	HBV ENV 313 3702	
	1145.07	IPILSSWAF	HBV ENV 313 3702	
	1145.09	FPVCLAFSY	HBV POL 541 3702	
	1145.10	FPHCLAFAY	HBV POL 541 3702	

【0246】

【表3】

表3 HCV由来のHTLエピトープ

ペプチド	配列	供給源	配列番号
p98.03	AAVAAQGYKVLVLPNSVAATLGFQAY	HCV NS3 1242-1267	
p98.04	AAVAAQGYKVLVLPNSVAAT	HCV NS3 1242	
p98.05	GYKVLVLPNSVAATLGFQAY	HCV NS3 1248	
1283.21	GYKVLVLPNSVAAT	HCV NS3 1248	
1283.20	GYKVLVLPNSVAATL	HCV NS3 1253	
	AQGYKVLVLPNSVAA	HCV NS3 1251	
F134.08	QEGAVQWMNRLLIAFASRGNIIVS	HCV NS4 1914-1935	
1283.44	QEGAVQWMNRLLIAFASRGNIIV	HCV NS4 1914	
1283.16	MNRLLIAFASRGNIIVS	HCV NS4 1921	
1283.55	SKGWRLLAIPITAYAQ	HCV NS3 1025	
F134.05	GSSYGFQYSPQQRVE	HCV NS5 2641	
1283.61	NFISGIQYLAGLSTLPGNPA	HCV NS4 1772	
1283.25	ASCLRKLGVPPPLRVW	HCV NS5 2939	
35.0107	GRHJFCHSKKKCDE	HCV NS3 1393	
35.0106	TVDFSLDPTFTTET	HCV 1466	
	VVVVATDALMTGYTG	HCV 1437	

【0247】

【表4】

表4 HCV由来のCTLエピトープ

スーパータイプ	ペプチド	配列	供給源	配列番号
A2	1090.18	FLLDARV	HCV NS1/E2 728	
	1073.05	LI.FNILGGWV	HCV NS4 1812	
	1013.02	YLVA YQATV	HCV NS3 1590	
	1013.1002	DLMGYIPLV	HCV Core 132	
	1090.22	RLIVFPDLGV	HCV NS5 2611	
	24.0075	VLVGGVLA	HCV NS4 1666	
	24.0073	WMNRLIARA	HCV NS4 1920	
	1174.08	HMWNFISGI	HCV NS4 1769	
	1073.06	ILAGYGAGV	HCV NS4 1851	
	24.0071	LLFLLADA	HCV NS1/E2 726	
	1073.07	YLPRRGPRL	HCV Core 35	
	1.0119	YLVTRHADV	HCV NS3 1136	
	1.0952	KTSESRQR	HCV Core 51	
	1073.10	GVAGALVAFK	HCV NS4 1863	
	1.0123	LIFCHSKKK	HCV NS3 1391	
	1.0955	QLFTTSPRR	HCV E1 290	
	1073.11	RLGVRATRK	HCV Core 43	
	1073.13	RMVVGGEHR	HCV NS1/E2 635	
B7	24.0090	VAGALVAFK	HCV NS4 1864	
	F104.01	VGIYLLPNR	HCV NS5 3036	
	1145.12	LPGSFSIF	HCV Core 168	
その他	29.0015	IPFYGKAI	HCV 1378	
	1069.62	CTCGSSDLY	HCV NS3 1128	
	24.0092	FWAKIMWNIP	HCV NS4 1765	
	13.0019	LSAFSLIISY	HCV NS5 2922	

表4 (続き) HCV由来のCTLエピトープ

スーパータイプ	ペプチド	配列	供給源	配列番号
A3	24.0086	LGFGAYMSK	HCV NS3 1267	
	1174.21	RVCEKMALY	HCV NS3 2621	
	1174.16	WMNSTGFTK	HCV NS1/E2 357	
	1073.04	TLHGPTPLLY	HCV NS3 1622	
B7	16.0012	FVYLVAYQA	HCV NS3 1588	
	15.0047	YPCIVNFTI	HCV NS1/E2 623	
	24.0093	EVDGVRILRY	HCV NS5 2129	
その他	3.0417	LTCCFADLMGY	HCV 126	
	1073.01	NIVDVQYLY	HCV E1 700	
	1.0509	GLSAFSLHSY	HCV NS5 2921	
	1073.17	MYVGDLCGSVF	HCV E1 275	
	1073.18	MYVGGVEHRL	HCV NS1/E2 633	
	13.075	QYLAGLSTL	HCV NS4 1778	
	1145.13	FPGCSFSIF	HCV Core 168	
	1145.23	LPGCMFSIF	HCV Core 168	
	1292.24	LPGCSFSII	HCV Core 169	
	1145.14	LPVCSFSIF	HCV Core 168	
	1145.15	LPGCSFSYF	HCV Core 168	

【0249】

【表5】

表5 HIV由来のHTLエピトープ

ペプチド	配列	供給源	配列番号
27.0313	GEYKRWIILGLNKIVRMYSPTSILD	HIV GAG 294-319	
27.0311	KRWIILGLNKIVRMYSPTSILD	HIV gag 298-319	
27.0354	KRWIILGLNKIVRMYS	HIV1 GAG 298	
27.0377	GEYKRWIILGLNKI	HIV1 GAG 294	
	WEFNTPLVYKLWYQ	HIV1 POL 596	
	QKQTKIQNERVYR	HIV1 POL 956	
1280.03	EKVYLAWVPAHKIGGG	HIV1 POL 711-726	
27.0361	KVYLAWVPAHKIGGG	HIV POL 712	
	EKVYLAWVPAHKIGG	HIV1 POL 711	
27.0304	PIVQNIQGMVHQALSPRTLNA	HIV1 gag 165-186	
27.0297	QGMVHQALSPRTLNA	HIV1 GAG 171	
27.0344	QHLLQLTVWGIKQLQ	HIV1 ENV 729	
F091.15	SPAIFQSSMTKILEP	HIV1 POL 335	
27.0341	IKQFINMWQEVGKAMY	HIV1 ENV 566	
27.0364	FRKYTAFTIPSINNE	HIV1 POL 303	
27.0373	HISNWRAMASDENLPP	HIV1 POL 758	
	KTAVQMAVFIHFKR	HIV1 POL 915	
	DRVHPVHAGPIAPQGMREPRGS	HIV GAG 245	
	AFSPEVPMFSALSEGATPQDLNML	HIV gag 195-216	
	AFSPEVPMFSALSEGATPQDL	HIV gag 195-216	
200.06	SALSEGATPQDLNML	HIV gag 205	
27.0307	SPEVPMFSALSEGA	HIV gag 197	
	1.QEQIGWMITNNIPVGIYKR	HIV gag 275	
27.0310	QEQIGWMITNNIPV	HIV gag 276	
35.0135	YRKILRQRKIDRLID	HIV VPU 31	
35.0131	WAGIKQEFIPYNPQ	HIV POL 874	
35.0127	EVNIVTDSQVALGII	HIV POL 674	
35.0125	AETFYVDGAANRETK	HIV POL 619	
35.0133	GA VVIQDINSIKVYP	HIV POL 989	

【0250】

【表6】

表6 HIV由来のCTLエピトープ

スーパータイプ	ペプチド	配列	供給源	配列番号
A2	25.0148	MASDFNLPV	HIV1 POL 70	
	1069.32	VLAEMSQV	HIV gag 397	
	1211.04	KLTPLCVTL	HIV ENV 134	
	25.0062	KLVGKLNWA	HIV1 POL 87	
	25.0039	LTGWCFKL	HIV1 NEF 62	
	941.031	ILKBPVHGV	HIV1 pol 476-484	
	25.0035	MTNNPPPV	HIV1 GAG 34	
	25.0057	RILOQLLF	HIV1 VPR 72	
	1.0944	AVFIHNEK	HIV POL 1434	
	1.1056	KIQNPRVYYR	HIV POL 1474	
A3	1069.49	QMAVFIHNEK	HIV pol 1432	
	966.0102	AIPQSSMTK	HIV pol 337	
	1150.14	MAVFIHNEK	HIV pol 909	
	940.03	QVPLRPMTYK	HIV nef 73-82	
	25.0175	TTLFCASDAK	HIV1 ENV 81	
	1069.43	TVYYGVVWVK	HIV env 49	
	25.0209	VTIKIGGQLK	HIV1 POL 65	
	1146.01	FPVRPQVPL	HIV nef 84-92	
	29.0060	IPHYCAPA	HIV env 293	
	15.0073	IPSPHETV	HIV POL 171	
B7	29.0056	CPKVSFEPI	HIV env 285	
	29.0107	IPYNPQSGVV	HIV pol 883	
	25.0151	CTLNPFISH	HIV1 POL 96	
	25.0143	LTGWCFKLV	HIV1 NEF 62	
	25.0043	YTAFTPSI	HIV1 POL 83	
	25.0055	AHRILQQL	HIV1 VPR 76	
	25.0049	ALVEICTEM	HIV1 POL 52	
	25.0032	LLQLTVWGI	HIV1 ENV 61	
	25.0050	LVGPTPVNI	HIV1 POL 100	
	25.0047	KAACWWAGI	HIV1 POL 65	
A2	25.0162	KMIGGGGHI	HIV1 POL 96	
	25.0052	RAMASDFNL	HIV1 POL 78	
	1211.09	SLLNATDIAY	HIV ENV 814	

表6 (続き) HIV由来のCTLエピトープ

スーパータイプ	ペプチド	配列	供給源	配列番号
A2	25.0041	TLNRPSP	HIV POL 96	
A3	1.0046	JVIWGKTPK	HIV POL 1075	
	25.0064	MVHQAIAPR	HIV1 GAG 45	
	1.0062	YLAWVPATK	HIV POL 1227	
	1.0942	MTKILIEPR	HIV POL 859	
	25.0184	QMVIIQAIAPR	HIV1 GAG 45	
	1069.48	AVFIINPKRK	HIV pol 1434	
	1069.44	KLGRWPVK	HIV pol 1358	
	1069.42	KVYLA WVPATK	HIV pol 1225	
	1.0024	NTPVFAIKK	HIV pol 752	
	25.0062	RIVELLGRR	HIV1 ENV 53	
	25.0095	TIKGGQLK	HIV1 POL 65	
	25.0078	TLFCASDAK	HIV1 ENV 82	
	25.0104	VMVWQVDR	HIV1 VIF 83	
	1069.47	VTYVYGVVWK	HIV env 48	
B7	15.0268	YPLASLRSLF	HIV GAG 507	
	1292.13	HPVIAAGPIA	HIV GAG 248	
	19.0044	VPLQLPPL	HIV con. REV 71	
その他	1.0431	EVNIVDSQY	HIV POL 1187	
	1.0014	FRDYVDRFY	HIV GAG 298	
	25.0113	IWGCSGKLI	HIV1 ENV 69	
	25.0127	IYETYGDTW	HIV1 VPR 92	
	1069.60	IYQEPKNL	HIV pol 1036	
	2.0129	IYQYMDOLY	HIV pol 359	
	25.0128	IYNEWTFEI	HIV1 VPR 56	
	25.0123	IYNTVFAI	HIV1 POL 74	
	1069.57	RYLKDQQLI	HIV env 2778	
	1069.58	RYLKDQQLI	HIV env 2778	
	1069.59	TYQYQEPF	HIV pol 1033	
	1069.27	VYQYMDOLY	HIV pol 358	
	1069.26	VTVLDVGDAY	HIV pol 265	
	25.0115	VWKEATTL	HIV1 ENV 47	
	25.0218	VWKEATTLF	HIV1 ENV 47	
	25.0219	YMQATWPEW	HIV1 POL 96	

表6 (続き) HIV由来のCTLエピトープ

スーパータイプ	ペプチド	配列	供給源	配列番号
A2	121.4	SLNATAIAV	HIV MN ep160.814(a)	
A3	F105.21	AIFQSSMTR	HIV pol 337(a)	
	F105.17	AIFQSSMTR	HIV pol 337(a)	
	F105.02	GIHQSSMTK	HIV pol 337(a)	
	F105.03	AAIQSSMTK	HIV pol 337(a)	
	F105.04	AIHQSSMTK	HIV pol 337(a)	
	F105.05	AIHQSSMTK	HIV pol 337(a)	
	F105.06	AIFQSSMTK	HIV pol 337(a)	
	F105.07	AIFQSSMTK	HIV pol 337(a)	
	F105.08	AIFQSSMTK	HIV pol 337(a)	
	F105.09	AIFQSSMTK	HIV pol 337(a)	
	F105.11	AIFQSSMTK	HIV pol 337(a)	
	F105.12	AIFQSSMTK	HIV pol 337(a)	
	F105.16	AIFQSSMTK	HIV pol 337(a)	
B7	1145.03	FPVIRPQVPL	HIV nef 84-92 T707	
	1181.03	FPVIRPQVPI	HIV nef 84-92(a)	
	1292.14	HPVHAGPII	HIV GAG 248	
	1292.09	FPISPIGTI	HIV POL 179	
	1145.02	FPVIRPQVPL	HIV nef 84-92 T707	
	1145.22	FPVIRPQVPL	HIV nef 84-92(a)	
	1181.04	FPVIRPQVPM	HIV nef 84-92(a)	
	1181.01	FPVIRPQVPA	HIV nef 84-92(a)	
	1181.02	FPVIRPQVPV	HIV nef 84-92(a)	
	1181.05	FPVIRPQVPF	HIV nef 84-92(a)	
	1181.06	FPVIRPQVPW	HIV nef 84-92(a)	

【表7】

表7 P. falciparum由来のHTLエピトープ

ペプチド	配列	供給源	配列番号
F125.04	RINWVNIIAVPLAMKLI	Pf SSP2 61	
1188.14	IINWVNIIATVPLAMKLI	Pf SSP2 62	
1188.16	KSKYKLATSVLAGLL	Pf EXP1 71	
	LVNLLIFHINGKIKNSE	Pf LSA1 13	
F125.02	LVNLLIFHINGKIKNS	Pf LSA1 13	
27.0402	LLIPHINOKIKNSE	Pf LSA1 16	
1188.32	GLAYKFFVPGAATPY	Pf SSP2 512	
27.0392	SSVENVNVNSSIGLIM	Pf CSP 410	
27.0417	VKNVIGPFMKAVCVE	Pf SSP2 223	
27.0388	MRKLAILSVSSFLFV	Pf CSP 2	
27.0387	MINYYGKQENWYSLKK	Pf CSP 53	
1188.38	KYKIAGGIAGGLALL	Pf SSP2 494	
1188.13	AGLLGNVSTVLLGGV	Pf EXP1 82	
27.0408	QTNPKSLRLNLOVSE	Pf LSA1 94	
35.0171	PDSIQDSLKESRKLN	Pf SSP2 165	
35.0172	KCNLYADSAWENVKN	Pf SSP2 211	

【0254】

【表8】

表8 P. falciparum由来のCTLエピトープ

スーパータイプ	ペプチド	配列	供給源	配列番号
A2	1167.21	RLFFDLFLV	PfSSP2 14	
	1167.08	GLIMVLSFL	PfCSP 425	
	1167.12	VLAGLIGNV	PfEXP1 R0	
	1167.13	KILSVFPLA	PfEXP1 2	
	1167.10	GILGNVSTV	PfEXP1 83	
	1167.18	ILSVSSFLV	PfCSP 7	
	1167.19	VLLGGVGLVL	PfEXP1 91	
	1167.36	LACAGLAYK	PfSSP2 511	
	1167.32	QINFKSLLR	PfLSA1 94	
	1167.43	VTCNGHQVR	PfCSP 375	
A3	1167.24	ALFHHNK	PfEXP1 10	
	1167.28	GVSENIFLK	PfLSA1 105	
	1167.47	IVLSHNSYEK	PfLSA1 59	
	1167.51	LACAGLAYK	PfSSP2 510	
	1167.46	PILVNLLIFI	PfLSA1 11	
	1101.03	MPLETLQAI	PfSHEBA 77	
	1167.61	TPVAGEPAFF	PfSSP2 539	
	1167.14	RLFFDLFL	PfSSP2 14	
	1167.16	FMKAVCDEV	PfSSP2 230	
	1167.15	LIFFDLFLV	PfSSP2 15	
B7	1167.17	LLMDCSOSI	PfSSP2 51	
	1167.09	VLLGGVGLV	PfEXP1 91	
	19.0051	LPYGRINI	PfSSP2 126	
	16.0245	IQDENIGLY	PfLSA1 1794	
	16.0040	FVEALFQEV	PfCSP 15	
	1167.54	FYFILVNLL	PfLSA1 9	
	1167.53	KYKLATSVL	PfEXP1 73	
	1167.56	KYLIVIFLI	PfSSP2 8	
	15.0184	LPSENERGY	PfLSA1 1663	
	16.0130	PSDGKCNLY	PfSSP2 207	
その他	16.0077	PSENERGY	PfLSA1 1664	
	1167.57	PVAGEPAFF	PfSSP2 528	
	1167.55	YYIPIQSSL	PfLSA1 1671	

【0255】

【表9】

表9. MHCクラスII 標的化配列に融合したMHCクラスII エピトープをコードする発現ベクターによるT細胞増殖の活性化

免疫原	刺激ペプチド ¹			
	PADRE	OVA 323	CORE 128	
peptide + CFA ²	3.0 (1.1)	2.7 (1.2)	3.2 (1.4)	
pEP2.(PAOS).(-)	-	-	-	
pEP2.(AOS).(-)	5.6 (1.8)	-	-	
pEP2.(PAOS).(sigTh)	5.0 (2.9)	-	2.6 (1.5)	
pEP2.(PAOS).(IgαTh)	5.6 (2.1)	-	3.0 (1.6)	
pEP2.(PAOS).(LampTh)	3.8 (1.7)	-	3	
pEP2.(PAOS).(IiTh)	5.2 (2.0)	3.2 (1.5)	3.7 (1.5)	
pEP2.(PAOS).(H2M)	3.3 (1.3)	-	2.8	

¹培養物の幾何平均は、 $S \geq 2$

²増殖応答は、リンパ節において測定した。

【0256】

【表10】

表10 cDNAミニ遺伝子におけるCTLエピートプ

エピートプ	配列	MHC拘束	インビボでの免疫原性 (IFA)		
			MHC結合	CTL陽性	CTL応答 (幾何
			親和性	培養物の数	平均×/÷SD) ^b
			[IC30% (nM)]		ΔLU
HBV Core 18	FLPSDFFPSV	A2.1	3	6/6	73.0 (1.1)
HBV Env 335	WLSLLVPFV	A2.1	5	4/6	5.3 (1.6)
HBV Pol 455	GLSRYVARL	A2.1	76	ND ^c	ND
HIV Env 120	KLTPLCVTL	A2.1	102	2/5	6.4 (1.3)
HIV Pol 476	ILKEPVHGV	A2.1	192	2/5	15.2 (2.9)
HBV Pol 551-A	YMDDVVLGA	A2.1	200	0/6	-
HBV Pol 551-V	YMDDVVLGV	A2.1	5	6/6	8.2 (2.3)
HIV Env 49	TVYYGVPVWK	A11	4	28/33	13.4 (3.1)
HBV Core 141	STLPETTVVRR	A11	4	6/6	12.1 (2.6)
HBV Pol 149	HTLWKAGILYK	A11	14	6/6	13.1 (1.2)

^a ペプチドを、HLA-A2.1/K^bH-2^{b2}トランスジェニックマウスにおいてIFA中のTヘルパー細胞ペプチドと同時に免疫することにより試験した。

^b 陽性培養物の幾何平均CTL応答

^c ND. 行わず

【0257】

【表11】

表11 HLA A2.1/K^bトランスジェニックマウスにおけるpMin.1 DNA構築物の
免疫原性のまとめ

エпитーブ	CTL応答 ^a	
	陽性培養物数/総数 ^b	幾何平均の応答陽性 培養物[×/÷SD]
HBV Core 18	9/9	455.5 [2.2]
HIV Env 120	12/12	211.9 [3.7]
HBV Pol 551-V	9/9	126.1 [2.8]
HBV Pol 455	12/12	738.6 [1.3]
HIV Pol 476	11/11	716.7 [1.5]
HBV Env 335	12/12	43.7 [1.8]
HBV Core 18 (Theradigm) ^c	10/10	349.3 [1.8]

^aマウスを、pMin.1 DNAまたはTheradigm-HBVリポペプチドで免疫し、そして脾臓細胞培養物におけるCTL活性を、個々のペプチドエпитーブでのインビトロ刺激の後に決定した。4つの独立した実験の結果を示す。

^b実施例V、CTL陽性培養物の規定のための材料および方法を参照のこと。

^cHBV Core 18エпитーブを含むTheradigm-HBVリポペプチドで免疫したマウスの応答。

【0258】

【表12】

表12 HLA A11/K^bトランスジェニックマウスにおける免疫原性のまとめ

エピトープ	CTL応答 ^a	
	陽性培養物数/総数 ^b	幾何平均の応答陽性
		培養物[×/÷SD]
HBV Core 141	5/9	Δ LU 128.1 [1.6]
HBV Pol 149	6/9	267.1 [2.2]
HIV Env 43	9/9	40.1 [2.9]

^aマウスをpMin.1 DNAで免疫し、そして脾臓細胞培養物におけるCTL活性を、個々のA11拘束したエピトープでのインビトロ刺激の後に決定した。3つの独立した実験の幾何平均CTL応答を示す。

^bCTL陽性培養物の規定は、実施例V、材料および方法に記載される。

【図面の簡単な説明】

【図1】

図1は、マウス I i 遺伝子と、I i タンパク質のC L I P 配列に置換された汎DR エピトープ配列との融合物をコードする I i P A D R E 構築物のヌクレオチド配列およびアミノ酸配列（それぞれ、配列番号1および2）を示す。

【図2】

図2は、複数のMHCクラスII エピトープに融合したI i タンパク質の細胞質ドメイン、膜貫通ドメインおよび管腔ドメインの部分の融合物をコードする I 8 0 T 構築物のヌクレオチド配列およびアミノ酸配列（それぞれ、配列番号3および4）を示す。

【図3】

図3は、I i タンパク質の三量体化領域をコードする、複数のTヘルパーエピトープおよびI i タンパク質のアミノ酸残基101～215に融合したI i タンパク質の細胞質ドメイン、膜貫通ドメインおよび管腔ドメインの部分の融合物をコードする I i T h f u l l 構築物のヌクレオチド配列およびアミノ酸配列（それぞれ、配列番号5および6）を示す。

【図4】

図4は、複数TヘルパーエピトープならびにLAMP-1の膜貫通ドメインおよび細胞質ドメインに融合したマウス免疫グロブリン κ シグナル配列の融合物をコードする κ LAMP-Th構築物のヌクレオチド配列およびアミノ酸配列（それぞれ、配列番号7および8）を示す。

【図5】

複数のMHCクラスIIエピトープならびにH2-Mの膜貫通ドメインおよび細胞質ドメインに融合したH2-Mのシグナル配列の融合物をコードするH2M-Th構築物のヌクレオチド配列およびアミノ酸配列（それぞれ、配列番号9および10）を示す。

【図6】

図6は、複数のMHCクラスIIエピトープならびにH2-DOの膜貫通ドメインおよび細胞質ドメインに融合したH2-DOのシグナル配列の融合物をコードするH2O-Th構築物のヌクレオチド配列およびアミノ酸配列（それぞれ、配列番号11および12）を示す。

【図7】

図7は、インフルエンザマトリクスタンパク質のアミノ末端に融合した汎DRエピトープ配列の融合物をコードするPADRE-インフルエンザマトリクス構築物のヌクレオチド配列およびアミノ酸配列（それぞれ、配列番号13および14）を示す。

【図8】

図8は、B型肝炎表面抗原のアミノ末端に融合した汎DRエピトープ配列の融合物をコードするPADRE-HBV-s構築物のヌクレオチド配列およびアミノ酸配列（それぞれ、配列番号15および16）を示す。

【図9】

図9は、複数のMHCクラスIIエピトープならびにIg- α タンパク質の膜貫通ドメインおよび細胞質ドメインに融合したIg- α タンパク質のシグナル配列の融合物をコードするIg- α Th構築物のヌクレオチド配列およびアミノ酸配列（それぞれ、配列番号17および18）を示す。

【図10】

図10は、複数のMHCクラスIIエピトープならびにIg- β タンパク質の膜貫通ドメインおよび細胞質ドメインに融合したIg- β タンパク質のシグナル配列の融合物をコードするIg- β Th構築物のヌクレオチド配列およびアミノ酸配列（それぞれ、配列番号19および20）を示す。

【図11】

図11は、複数のMHCクラスIIエピトープに融合した κ 免疫グロブリンのシグナル配列の融合物をコードするSigTh構築物のヌクレオチド配列およびアミノ酸配列（それぞれ、配列番号21および22）を示す。

【図12】

ヒトHLA-DRの非改変体（Ii）タンパク質のヌクレオチド配列およびアミノ酸配列（それぞれ、配列番号23および24）を示す。

【図13】

図13は、ヒトリソソーム膜糖タンパク質-1（LAMP-1）のヌクレオチド配列およびアミノ酸配列（それぞれ、配列番号25および26）を示す。

【図14】

図14は、ヒトHLA-DMBのヌクレオチド配列およびアミノ酸配列（それぞれ、配列番号27および28）を示す。

【図15】

図15は、ヒトHLA-DO β のヌクレオチド配列およびアミノ酸配列（それぞれ、配列番号29および30）を示す。

【図16】

図16は、ヒトMB-1 Ig- α のヌクレオチド配列およびアミノ酸配列（それぞれ、配列番号31および32）を示す。

【図17】

図17は、ヒトIg- β タンパク質のヌクレオチド配列およびアミノ酸配列（それぞれ、配列番号33および34）を示す。

【図18】

図18は、複数のMHCクラスIIエピトープに融合したMHCクラスII標的化配列をコードするいくつかの構築物を作製する方法を示す模式図を示す。

【図19】

図19は、ベクター pEP2 のヌクレオチド配列（配列番号35）を示す。

【図20】

図20は、ベクター pMIN. 0 のヌクレオチド配列（配列番号36）を示す。

【図21】

図21は、ベクター pMIN. 1 のヌクレオチド配列（配列番号37）のヌクレオチド配列を示す。

【図22】

pMin. 1 DNAで免疫したHLA-A2. 1/K^b-H-2^{b*5}マウスにおける代表的なCTL応答。プライムした動物からの脾細胞は、三連のフラスコ中で培養され、そしてインビトロで各ペプチドエピトープを用いて2回刺激された。各培養物の細胞傷害性は、ペプチドの存在（黒記号、実線）または非存在（白記号、点線）下で、Jurkat-A2. 1/K^b標的細胞に対する⁵¹Cr放出アッセイにおいてアッセイされた。各記号は、単一培養の応答を示す。

【図23】

DNAミニ遺伝子でトランスフェクトしたJurkat-A2. 1/K^b腫瘍細胞による、特定のCTLへのウイルスエピトープの提示。2つの構築物は、トランスフェクション（pMin. 1およびpMin. 2-GFP）に使用された。pMin. 2-GFPをトランスフェクトされた標的細胞は、FACSにより選別され、そして本実験に使用された集団は60%の蛍光細胞を含んだ。CTL刺激は、IFN- γ 放出の量を定量することによってか（A、B）、または⁵¹Cr標識標的細胞の溶解によって（C、D、灰色のバー）、測定された。CTLは、1 μ g/mlのペプチド（B、D）の存在下で、トランスフェクトした細胞を用いてか（A、C）、または親Jurkat-A2. 1/K^b細胞を用いて、刺激された。エピトープの非存在下において、IFN- γ 放出のレベルおよび異なるCTL株の細胞傷害性は、それぞれ、72~126 pg/mlおよび2~6%に変動した。

【図24】

インビボでの免疫原性に重要である変動性に取り組むために使用される改変したミニ遺伝子構築物の概要。以下の改変は、プロトタイプ pM i n. 1 構築物中に組み込まれた；A、P A D R E H T L エピトープの欠失；B、9 位にアラニンを含むネイティブな H B V P o l 5 5 1 エピトープの取り込み；C、I g κ シグナル配列の欠失；および D、H B V E n v 3 3 5 および H B V P o l 4 5 5 エピトープのスイッチング位置。

【図 2 5】

p M i n. 1 免疫原性に影響し得る変動性の試験。p M i n. 1 のインビボでの C T L 誘導活性は、改変した構築物と比較される。比較の容易さのために、各々の改変した D N A ミニ遺伝子構築物により誘導された C T L 応答（灰色のバー）は、各々の 4 つのパネルにおいて、プロトタイプ p M i n. 1 構築物により誘導された応答（黒いバー）に別々に比較される。2 ～ 5 つの独立した実験からの C T L 陽性培養の幾何平均応答が、示される。各々のバーで示される数は、陽性培養物の数／その特定のエピトープについて試験した総数を示す。陽性培養物／p M i n. 1 群について試験した合計の比は、パネル A に示され、そして残りの図のパネルについても同様である（実施例 V、材料および方法、インビトロ C T L 培養、陽性 C T L 培養の定義についてを参照のこと）。T h e r a d i g m 応答は、リポペプチドで動物を免疫すること、ならびに H B V C o r e 1 8 - 2 7 ペプチドで脾細胞培養物を刺激および試験することによって得られた。

【図1】

```

      10      20      30      40      50      60      70
      *      *      *      *      *      *      *
GCTAGCGCCGCCACCATGGATGACCAACGCGACCTCATCTCTAACCATGAGCAATTGCCCATACTGGGCA
CGATCGCGGCGGTGGTACCTACTGGTGGCGCTGGAGTAGAGATTGGTACTCGTTAACGGGTATGACCCGT
      M D D Q R D L I S N H E Q L P I L G>

      80      90      100     110     120     130     140
      *      *      *      *      *      *      *
ACCGCCCTAGAGAGCCAGAAAGSTGCAGCCGTGGAGCTCTGTACACCGGTGTTTCTGTCTGGTGGCTCT
TGGCGGGATCTCTCGGTCTTTCCACGTGGCGACCTCGAGACATGTGGCCACAAAGACAGGACCACCGAGA
N R P R E P E R C S R G A L Y T G V S V L V A L>

      150     160     170     180     190     200     210
      *      *      *      *      *      *      *
GCTCTTGGCTGGGCGAGGCCACCACTGCTTACTTCTGTACCAAGCAAGGGCGCGCTAGACAAGCTGACC
CGAGAACCGACCCGTCCGGTGGTGACGAATGAAGGACATGGTCTGTGTCCCGGGGATCTGTTTCGACTGG
      L L A G Q A T T A Y F L Y Q Q Q G R L D K L T>

      220     230     240     250     260     270     280
      *      *      *      *      *      *      *
ATCACCTCCAGAACCTGCAACTGGAGAGCCTTCGCATGAAGCTTCGGAATCTGCCAACCTGTGGCCA
TAGTGGAGGGTCTTGGAGCTTGACCTCTCGGAAGCGTACTTCAAGGCTTTAGACGGTTTGGACACCGGT
      I T S Q N L Q L E S L R M K L P K S A K P V A>

      290     300     310     320     330     340     350
      *      *      *      *      *      *      *
AGTTCGTGGCTGCGCTGGACCTGAAGGCTGCCGCTATGTCCATGGATAACATGCTCCTTGGGCGCTGTGA
TCAAGCACCGACGAGCCTGGGACTTCCGACGGCGATACAGGTACTTATGTACGAGGAACCCGGACACTT
      K F V A A W T L K A A A M S M D N M L L G P V K>

      360     370     380     390     400     410     420
      *      *      *      *      *      *      *
GAACGTTACCACTACGGCAACATGACCCAGGACCATGTGATGCATCTGCTCAAGAGGTCTGGACCCCTG
CTTGCAATGGTTTCATGCCGTGTACTGGGTCTGTGACTACGTAGACGAGTGTCTCCAGACCTGGGGAC
      N V T K Y G N M T Q D H V M H L L T R S G P L>

      430     440     450     460     470     480     490
      *      *      *      *      *      *      *
GAGTACCCGCGAGCTGAAGGGGACCTTCCAGAGAACTCTGAAGCATCTTAAGAAGTCCATGGATGGCGTGA
CTCATGGGCGTGCAGCTTCCCTGGAAGGGTCTCTTAGACTTCGTAGAATTCTTGAGGTACCTACCGCACT
      E Y P Q L K G T Y P E N L K H L K N S M D G V>

      500     510     520     530     540     550     560
      *      *      *      *      *      *      *
ACTGGAAGATCTTCGAGAGCTGGATGAAGCAGTGGCTCTTGTITGAGATGAGCAAGAACTCCCTGGAGGA
TGACCTTCTAGAAGCTCTCGACCTACTTCGTCAACCGAGAACAACCTCTACTCGTTCTTGAGGGACCTCCT
      N W K I F E S W M K Q W L L F E M S K N S L E E>

      570     580     590     600     610     620     630
      *      *      *      *      *      *      *
GAAGAAGCCACCGAGGCTCCACCTAAAGAGCCACTGGACATGGAAGACCTATCTTCTGGCCTGGGAGTG
CTTCTTCGGGTGGCTCCGAGGTGGATTCTCGGTGACCTGTACCTTCTGGATAGAAGACCGGACCTCAC
      K K P T E A P P K E P L D M E D L S S G L G V>

      640     650     660
      *      *      *
ACCAGGCAGAACTGGGTCAAGTCACCCCTGTGAGGTACC
TGGTCCGTCTTGACCCAGTTCAGTGGGACACTCCATGG
      T R Q E L G Q V T L *>

```

FIGURE 1

【図2】

```

      10      20      30      40      50      60      70
      *      *      *      *      *      *      *
GCTAGCGCCGCCACCATGGATGACCAACGCGACCTCATCTCTAACCATGAGCAATTGCCCATACTGGGCA
CGATCGCGGCGGTGGTACCTACTGGTTGCGCTGGAGTAGAGATTGGTACTCGTTAACGGGTATGACCCGT
      M D D Q R D L I S N H E Q L P I L G>

      80      90      100     110     120     130     140
      *      *      *      *      *      *      *
ACCGCCCTAGAGAGCCAGAAAGGTGCAGCCGTGGAGCTCTGTACACCGGTGTTTCTGTCTGCTGGTCTCT
TGGCGGGATCTCTCGGTCTTTCCACGTCGGCACCTCGAGACATGTGGCCACAAAGACAGGACCACCCGAGA
N R P R E P E R C S R G A L Y T G V S V L V A L>

      150     160     170     180     190     200     210
      *      *      *      *      *      *      *
GCTCTTGGCTGGGCGAGGCCACCACTGCTTACTTCTGTACCAAGCAACAGGGCCGCTAGACAAGCTGACC
CGAGAACCAGCCCGTCCGTTGGTGACGAATGAAGGACATGGTCGTTGTCCCGCGGATCTGTTGACTGG
      L L A G Q A T T A Y F L Y Q Q Q G R L D K L T>

      220     230     240     250     260     270     280
      *      *      *      *      *      *      *
ATCACCTCCAGAACCTGCAACTGGAGAGCCCTTCGCATGAAGCTTATCAGCCAGGCTGTGCACGCCGCTC
TAGTGGAGGGTCTTGGACGTTGACCTCTCGGAAGCGTACTTCGAATAGTCGGTCCGACACGTGCGGCGAG
      I T S Q N L Q L E S L R M K L I S Q A V H A A>

      290     300     310     320     330     340     350
      *      *      *      *      *      *      *
ACGCCGAAATCAACGAAGCTGGAAGAACCCCTCCAGCTTATCGCCCTCCAAACGCTCCTATCCTGTTCTT
TGGCGCTTTAGTTGCTTCGACCTTCTTGGGGAGGTCGAATAGCGGGAGGTTTGCAGAGATAGGACAAGAA
H A E I N E A G R T P P A Y R P P N A P I L F F>

      360     370     380     390     400     410     420
      *      *      *      *      *      *      *
TCTGCTGACCAAGATCCTGACAATCCCCAGTCCCTGGACGCCAAGTTTCGTGGCTGCCTGGACCCCTGAAG
AGACGACTGGTCTTAGGACTGTTAGGGGTCAGGGACCTGCGGTTCAAGCACCGACGGACCTGGGACTTC
      L L T R I L T I P Q S L D A K F V A A W T L K>

      430
      *      *
GCTGCCGCTTGAGGTACC
CGACGGCGAAGTCCATGG
      A A A *>

```

FIGURE 2

【図3】

```

      10      20      30      40      50      60      70
      *      *      *      *      *      *      *
GCTAGCGCGCCACCATGGATGACCAACGCGACCTCATCTCTAACCATGAGCAATTGCCCATACTGGGCA
CGATCGCGCGGTGGTACCTACTGGTTGCGCTGGAGTAGAGATTGGTACTCGTTAACGGGTATGACCCGT
      M D D Q R D L I S N H E Q L P I L G>

      80      90      100     110     120     130     140
      *      *      *      *      *      *      *
ACCGCCCTAGAGAGCCAGAAAGGTGCGCCGTGGAGCTCTGTACACCGGTGTTTCTGTCTGGTGGCTCT
TGGCGGGATCTCTCGGTCTTTCACGTCGGCACCTCGAGACATGTGGCCACAAAGACAGGACCACCGAGA
      N R P R E P E R C S R G A L Y T G V S V L V A L>

      150     160     170     180     190     200     210
      *      *      *      *      *      *      *
GCTCTTGGCTGGGCGAGGCCACCTGCTTACTTCTGTACAGCAACAGGCGCGCTAGACAAGCTGACC
CGAGAACCGACCCGTCGCGTGGTGACGAATGAAGACATGGTCTGTCTCCCGCGGATCTGTTGACTGG
      L L A G Q A T T A Y F L Y Q Q Q G R L D K L T>

      220     230     240     250     260     270     280
      *      *      *      *      *      *      *
ATCAGCTCCCAAGACCTGCAACTGGAGAGCCCTTCGATGAAGCTTATCAGCCAGGCTGTGCAAGCCGCTC
TAGTGGAGGGTCTTGGACGTTGACCTCTCGGAAGCGTACTTCGAATAGTCGGTCCGACACGTGCGGCGAG
      I T S Q N L Q L E S L R M K L I S Q A V H A A>

      290     300     310     320     330     340     350
      *      *      *      *      *      *      *
ACGCGGAATCAACGAAGCTGGAAGAACCCTCCAGCTTATCGCCCTCCAAACGCTCCTATCCTGTTCTT
TGCGGCTTTAGTTGCTTCGACCTTCTTGGGAGGTGCAATAGCGGAGGTTTGGGAGCATAGGACAAGAA
      H A E I N E A G R T P P A Y R P P N A P I L P F>

      360     370     380     390     400     410     420
      *      *      *      *      *      *      *
TCTGCTGACCAGAATCCTGACAATCCCCAGTCCCTGGACGCCAAGTTCGTGGCTGCCTGGACCCTGAAG
AGACGACTGGTCTTAGGACTGTTAGGGGGTCAGGGACCTGCGGTTCAAGCACCGACGGACCTGGGACTTC
      L L T R I L T T P Q S L D A K F V A A W T L K>

      430     440     450     460     470     480     490
      *      *      *      *      *      *      *
GCTGCCGCTATGTCCATGGATAACATGCTCCTTGGGCCTGTGAAGAACGTTACCAAGTACGGCAACATGA
CGACGGCGATACAGGTACCTATTGTACGAGGAACCCGGACACTTCTTGCAATGGTTCATGCCGTTGTACT
      A A A M S M D N M L L G P V K N V T K Y G N M>

      500     510     520     530     540     550     560
      *      *      *      *      *      *      *
CCCAGGACCATGTGATGCATCTGCTCAGGAGTCTGGACCCCTGGAGTACCCGACGCTGAAGGGGACCTT
GGGTCTCTGCTACACTACGTAGACGAGTGTCCAGACCTGGGGACCTCATGGGCGTCGACTTCCCTTGGAA
      T Q D H V M H L L T R S G P L E Y P Q L K G T F>

      570     580     590     600     610     620     630
      *      *      *      *      *      *      *
CCCAGAGAATCTGAAGCATCTTAAGAACTCCATGGATGGCGTGAAGTGAAGATCTTCGAGAGCTGGATG
GGGTCTCTTAGACTTCGTAGAATCTTGAGGTACCTACCGCACTTGACCTTCTAGAAGCTCTCGACCTAC
      P E N L K H L K N S M D G V N W K I F E S W M>

```

FIGURE 3

【図3-1】

```

      640      650      660      670      680      690      700
      *      *      *      *      *      *      *
AAGCAGTGGCTCTTGTTGAGATGAGCAAGAAGTCCCTGGAGGAGAAGAAGCCCACCGAGGCTCCACCTA
TTCGTACCGAGAACAAGTCTACTCGTTCTTGAGGGACCTCCTCTTCTTCGGGTGGCTCCGAGGTGGAT
K Q W L L F E M S K N S L E E K K P T E A P P>

      710      720      730      740      750      760      770
      *      *      *      *      *      *      *
AAGAGCCACTGGACATGGAAGACCTATCTTCTGGCCTGGGAGTGACCAGGCAGGAAGTGGGTCAAGTCAC
TTCTCGGTGACCTGTACCTTCTGGATAGAAGACCGGACCCCTCACTGGTCCGTCCTTGACCCAGTTCAGTG
K E P L D M E D L S S G L G V T R Q E L G Q V T>

      780
      *      *
CCTGTGAGGTACC
GGACACTCCATGG
L *>

```

FIGURE 3 CONTINUED

【図4】

```

      10      20      30      40      50      60      70
      *      *      *      *      *      *      *
GCTAGCGCGCCACCATGGGAATGCAGGTGCAGATCCAGAGCCTGTTTCTGCTCCTCCTGTGGGTGCCCG
CGATCGCGCGCGGTGGTACCCCTTACGTCCACGTCTAGGTCTCGGACAAAGACGAGGAGGACACCCACGGGC
      M G M Q V Q I Q S L F L L L L W V P>

      80      90      100     110     120     130     140
      *      *      *      *      *      *      *
GGTCCAGAGGAATCAGCCAGGCTGTGCACGCGCTCACGCCGAAATCAACGAAGCTGGAAGAACCCTCC
CCAGGTCTCCTTAGTCCGTCCGACACGTGCGGCGAGTGCGGCTTAGTTGCTTCGACCTTCTTGGGGAGG
G S R G I S Q A V H A A H A E I N E A G R T P P>

      150     160     170     180     190     200     210
      *      *      *      *      *      *      *
AGCTTATCGCCCTCCAAAGCCTCCTATCCTGTTCTTCTGCTGACCAGAATCCTGACAATCCCCAGTCC
TCGAATAGCGGGAGGTTTCCGAGGATAGGACRAGAAAGACGACTGGTCTTAGGACTGTTAGGGGTCAGG
A Y R P P N A P I L F F L L T R I L T I P Q S>

      220     230     240     250     260     270     280
      *      *      *      *      *      *      *
CTGGACGCCAAGTTCTGTGGCTGCCTGGACCCTGAAGGCTGCCGCTAACACATGTTGATCCCCATTGCTG
GACCTGCGGTTCAAGCACCGACGGACCTGGGACTTCCGACGGCGATTGTTGTACAACCTAGGGGTAACGAC
L D A K F V A A W T L K A A A N N M L I P I A>

      290     300     310     320     330     340     350
      *      *      *      *      *      *      *
TGGGCGGTGCCCTGGCAGGGCTGCTCCTCATCGTCCCTCATGCTACCTCATTGGCAGGAAGAGGAGTCA
ACCCGCCACGGGACCGTCCCGACCGAGTAGCAGGAGTAACGGATCGAGTAACCGTCCTTCTCCTCAGT
V G G A L A G L V L I V L I A Y L I G R K R S H>

      360     370
      *      *      *      *
CGCGGGCTATCAGACCATCTAGGGTACC
GCGGCCGATAGTCTGGTAGATCCCATGG
A G Y Q T I *>

```

FIGURE 4

【図5】

```

      10      20      30      40      50      60      70
      *      *      *      *      *      *      *
GCTAGCGCCGCCACCATGGCTGCACTCTGGCTGCTGCTGGTCCTCAGTCTGCACTGTATGGGGATCA
CGATCGCGGCGGTGGTACCGACGTGAGACCGACGACGACGACCAGGAGTCAGACGTGACATACCCCTAGT
      M A A L W L L L L V L S L H C M G I>

      80      90      100     110     120     130     140
      *      *      *      *      *      *      *
GCCAGGCTGTGCACGCCGCTCACGCCGAATCAACGAAGCTGGAAGAACCCCTCCAGCTTATCGCCCTCC
CGGTCCGACACGTGCGGCGAGTGCGGCTTTAGTTGCTTCGACCTTCTTGGGGAGGTGCAATAGCGGGAGG
S Q A V H A A H A E I N E A G R T P P A Y R P P>

      150     160     170     180     190     200     210
      *      *      *      *      *      *      *
AAACGCTCCTATCCTGTTCTTCTGCTGACCAAGAATCCTGACAATCCCCCAGTCCCTGGACGCCAAGTTC
TTTCCGAGGATAGGACAAGAAAGACGACTGGTCTTAGGACTGTTAGGGGGTCAGGGACCTGCGGTTCAAG
N A P I L F F L L T R I L T I P Q S L D A K P>

      220     230     240     250     260     270     280
      *      *      *      *      *      *      *
GTGGCTGCCTGGACCCCTGAAGGCTGCCGCTAAGGTCTCTGTGTCTGCAGCCACCCCTGGGCCTGGGCTTCA
CACCGACGGACCTGGGACTTCCGACGGCGATTCCAGAGACACAGACGTCCGGTGGGACCCGGACCCGAAGT
V A A W T L K A A A K V S V S A A T L G L G F>

      290     300     310     320     330     340     350
      *      *      *      *      *      *      *
TCATCTTCTGTGTTGGCTTCTTCAGATGGCGCAAGTCTCATTCCTCCAGCTACACTCCTCTCCCTGGATC
AGTAGAAGACACAACCGAAGAAGTCTACCGCGTTTCAGAGTAAGGAGGTGATGTGAGGAGAGGGACCTAG
I I F C V G F F R W R K S H S S S Y T P L P G S>

      360     370     380
      *      *      *
CACCTACCCAGAAGGACGGCATTAGGGTACC
GTGGATGGGTCTTCCTGCCGTAATCCCATGG
T Y P E G R H *>

```

FIGURE 5

【図6】

```

      10      20      30      40      50      60      70
      *      *      *      *      *      *      *
GCTAGCGCCGCCACCATGGGCGCTGGGAGGGCCCCCTGGGTGGTGGCTCTGTTGGTGAACCTCATGAGGC
CGATCGCGGCGGTGGTACCCGCGACCCCTCCCGGGGAGCCACCACCGAGACAACCACTTGGAGTACTCCG
      M G A G R A P W V V A L L V N L M R>

      80      90      100     110     120     130     140
      *      *      *      *      *      *      *
TGGATTCCATCAGCCAGGCTGTGCACGCCGCTCACGCCGAATCAACGAAGCTGGAAGAACCCTCCAGC
ACCTAAGGTAGTCGGTCCGACACGTGCGGCGAGTGCGGCTTTAGTTGCTTCGACCTTCTTGGGGAGGTGG
L D S I S Q A V H A A H A E I N E A G R T P P A>

      150     160     170     180     190     200     210
      *      *      *      *      *      *      *
TTATCGCCCTCCAAACGCTCCCTATCCTGTTCTTTCTGCTGACCAGAATCCTGACAATCCCCCAGTCCCTG
AATAGCGGGAGGTTTTCGAGGATAGGACAAGAAAGACGACTGGTCTTAGGACTGTTAGGGGGTCAGGGAC
Y R P P N A P I L F F L L T R I L T I P Q S L>

      220     230     240     250     260     270     280
      *      *      *      *      *      *      *
GAGCCCAAGTTCGTGGCTGCCCTGGACCTGAAGGCTGCCCTATACTGAGTGGAGCTGCAGTGTTCCTGC
CTCGGTTTCAAGCACCGACGGACCTGGGACTTCCGACGGCGATATGACTCACCTCGACGTCAACAAGGACG
D A K F V A A W T L K A A A I L S G A A V F L>

      290     300     310     320     330     340     350
      *      *      *      *      *      *      *
TTGGGCTGATTGTCTTCCTGGTGGGGTTGTTATCCATCTCAAGGCTCAGAAAGCATCTGTGGAGACTCA
AACCCGACTAACAGAAGGACCAACCCCAACAATAGGTAGAGTTCGGAGTCTTTCTGACACCTCTGAGT
L G L I V F L V G V V I H L K A Q K A S V E T Q>

      360     370     380     390     400     410     420
      *      *      *      *      *      *      *
GCCTGGCAATGAGAGTAGSTCCCGGATGATGGAGCGGCTAACCAAGTTCAAGGCTGGACCGGGACATGTC
CGGACCGTTACTCTCATCCAGGGCCTACTACCTCGCCGATTGGTTCAAGTTCGACCTGGCCCTGTACAG
P G N E S R S R M M E R L T K F K A G P G H V>

      430
      *      *
ACATGAGGTACC
TGTACTCCATGG
T *>

```

FIGURE 6

【図7】

```

      10      20      30      40      50      60      70
      *      *      *      *      *      *      *
GCTAGCGCCGCCACCATGGCCAGTTTCGTGGCTGCCTGGACCCCTGAAGGCTGCCGCTATGAGTCTTCTAA
CSATCGCGCGGTGGTACCGGTTCAAGCACCGACGGACCTGGGACTTCOGACGGCGATACTCAGAAGATT
      M A X F V A A W T L K A A A M S L L>

      80      90      100     110     120     130     140
      *      *      *      *      *      *      *
CCGAGGTCGAAACGTACGTTCTCTATCATCCCATCAGGCCCCCTCAAAGCCGAGATCGCGCAGAGACT
GGCTCCAGCTTTGCATGCAAGAGAGATAGTAGGTTAGTCCGGGGAGTTTCGGCTCTAGCGGTCTCTGA
T E V E T Y V L S I I P S G P L K A E I A Q R L>

      150     160     170     180     190     200     210
      *      *      *      *      *      *      *
TGAGGATGTTTTTGCAGGAGAGACACAGATCTTGAGGCTCTCATGGAATGGCTAAAGACAAAGACCAATC
ACTCCTACAAAACGTCCCTTCTGTGTCTAGAAGTCCGAGAGTACCTTACCGATTCTGTCTGGTTAG
E D V F A G K N T D L E A L M E W L K T R P I>

      220     230     240     250     260     270     280
      *      *      *      *      *      *      *
CTGTCACTCTGACTAAGGGAAATTTAGGGTTTGTGTTACGCTCACCGTCCCGAGTGAGCGAGGACTGC
GACAGTGGAGACTGATTCCCTTAAATCCCAACACAAGTGGAGTGGCAGGGTCACTCGCTCCTGAGC
L S P L T K G I L G F V F T L T V P S E R G L>

      290     300     310     320     330     340     350
      *      *      *      *      *      *      *
AGCGTAGACGATTGTCCAAATGCCCTAAATGGGAATGGAGACCCAAACATGGACAGGGCAATTAA
TCGCATCTGCTAAACAGGTTTACGGGATTACCTTACCTCTGGGTTTGTGTACCTGTCCCGTCAATT
Q R R R F V Q N A L N G N G D P N N M D R A V K>

      360     370     380     390     400     410     420
      *      *      *      *      *      *      *
ACTATACAAGAAGCTGAAGAGGGAATGACATTCCATGGAGCAAAGGAAGTTGCACTCAGTTACTCAACT
TGATATGTTCTCGACTTCTCCCTTACTGTAAAGGTACCTCGTTTCCCTTCAACGTGAGTCAATGAGTTGA
L Y K K L K R E M T F H G A K E V A L S Y S T>

      430     440     450     460     470     480     490
      *      *      *      *      *      *      *
GGTGGCTTGCCAGTTGCATGGTCTCATATACAACCGGATGGGAACAGTGAACACAGAAGTGGCTCTTG
CCACGCGAACGGTCAACGTACCCAGAGTATATGTTGGCTTACCTTGTCACTGGTGTCTTACCGGAGAAC
G A L A S C M G L I Y N R M G T V T T E V A L>

      500     510     520     530     540     550     560
      *      *      *      *      *      *      *
GCCTAGTATGTGCCACTTGTGAGCAGATTGCTGATGCCCAACATCGGTCCACAGGCAGATGGCGACTAC
CGGATCATAACGGTGAACACTCTGTCTAACGACTACGGGTTGTAGCCAGGGTGTCCGTCTACCGCTGATG
G L V C A T C E Q I A D A Q H R S H R Q M A T T>

      570     580     590     600     610     620     630
      *      *      *      *      *      *      *
CACCAACCCACTAATCAGGCATGAGAACAGAATGGTACTAGCCAGCACTACGGCTAAGGCCATGGAGCAA
GTGGTTGGGTGATTAGTCCGTACTCTTGTCTTACCATGATCGGTCTGTATGCCGATTCGGGTACCTCGTT
T N P L I R E E N R M V L A S T T A K A M E Q>

      640     650     660     670     680     690     700
      *      *      *      *      *      *      *
ATGGCTGGATCAAGTGAGCAGGCAGCAGAGGCCATGGAAGTCGCAAGTCAGGCTAGACAAATGGTGAGG
TACCGACCTAGTTCAGTCTCGTCTCGTCTCCGGTACCTTCAGCGTTCAGTCCGATCTGTTTACCACGTCC
M A G S S E Q A A E A M E V A S Q A R Q M V Q>

```

FIGURE 7

【図7-1】

```

      710      720      730      740      750      760      770
      *      *      *      *      *      *      *
CAATGAGGACAATTGGGACTCACCCCTAGCTCCAGTGCAGGTCTAAAAGATGATCTTATTGAAAATTGCA
GTTACTCCTGTTAACCCCTGAGTGGGATCGAGGTACGTCAGATTTCTACTAGAATAACTTTTAACGT
A M R T I G T H F S S S A G L K D D L I E N L Q>

      780      790      800      810
      *      *      *      *      *      *      *
GGCTTACCAGAAACGGATGGGGGTGCAGATGCAGCGATTCAAGTGA
CCGAATGGTCTTTGCCTACCCCCACGTCTACGTGCTAAGTTCACT
A Y Q K R M G V Q M Q R F K *>

```

FIGURE 7 CONTINUED

【図8】

```

      10      20      30      40      50      60      70
      *      *      *      *      *      *      *
GCTAGCGCCGCCACCATGGCCAAGTTCTGTGGCTGCCTGGACCCCTGAAGGCTGCCGCTCTCGAGATTGGGG
CGATCGCGGGCGGTGGTACCGGTTCAAGCACCGACGACCTGGGACTTCCGACGGCGAGAGCTCTAACCCG
      M A K F V A A W T L K A A A L E I G>

      80      90      100     110     120     130     140
      *      *      *      *      *      *      *
GACCCCTGCCTGAACGCCGAGAACATCAGATCAGGATTCTAGGACCCCTTCTCGTGTACAGGGGGGTT
CTGGGACGGACTTGGCGCTCTTGTAGTGTAGTCTTAAGGATCCTGGGGAAGAGCACAATGTCCGCCCCAA
G P C L N A E N I T S G F L G P L L V L Q A G F>

      150     160     170     180     190     200     210
      *      *      *      *      *      *      *
TTTCTTGTGACAAGAATCCTCACAATACCGCAGAGTCTAGACTCGTGGTGGACTTCTCTCAATTTTCTA
AAAGAACAACCTGTTCTTAGGAGTGTATGGCGTCTCAGATCTGAGCACCACTGAAGAGAGTTAAAGAT
F L L T R I L T I P Q S L D S W W T S L N F L>

      220     230     240     250     260     270     280
      *      *      *      *      *      *      *
GGGGGAACCTACCGTGTCTTGGCCAAAATTCGCGAGTCCCCAACCTCCAATCACTCACCACCTCTTGTG
CCCCCTTGATGGCACACAGAACCCTTTTAAGCGTCAGGGGTTGGAGGTTAGTGAGTGGTGGAGAACAG
G G T T V C L G Q N S Q S P T S N H S P T S C>

      290     300     310     320     330     340     350
      *      *      *      *      *      *      *
CTCCAACCTTGTCTCTGTTATCGCTGGATGTGTCTGCGGCGTTTTCATCATCTTCTCTCTCTCTCTCT
GAGGTGTAACAGGACCAATAGCGACCTACACAGACCGCGAAAATAGTAGAAGGAGAAGTAGGACGACGA
P P T C P G Y R W M C L R R F I I F L F I L L L>

      360     370     380     390     400     410     420
      *      *      *      *      *      *      *
ATGCCCTCATCTTCTTGTGTGTTCTTCTGGACTATCAAGGTATGTTGCCCGTTTGTCTCTCTAATCCAGGA
TACGGAGTAGAAGAACAACCAAGAAGACCTGATAGTTCCATACAACGGGCAACAGGAGATTAAAGGTCT
C L I F L L V L L D Y Q G M L P V C P L I P G>

      430     440     450     460     470     480     490
      *      *      *      *      *      *      *
TCCTCAACAACAGCACGGGACCATGCCGACCTGCATGACTACTGCTCAGGAACCTCTATGTATCCCT
AGGAGTTGTTGGTGGTGGTACGGCTGGACGTACTGATGACGAGTTCTTGGAGATACATAGGGA
S S T T S T G P C R T C M T T A Q G T S M Y F>

      500     510     520     530     540     550     560
      *      *      *      *      *      *      *
CCTGTGCTGTACCAAACTTCGGACGGAATTCACCTGTATTCCCATCCCATCATCCTGGGCTTTCGG
GGACAACGACATGGTTTGAAGCCCTGCCTTTAACGTGGACATAAGGGTAGGGTAGTAGGACCCGAAGCC
S C C C T K P S D G N C T C I P I P S S W A F G>

      570     580     590     600     610     620     630
      *      *      *      *      *      *      *
AAAATTCCTATGGGAGTGGGCTCAGCCCGTTTCTCCTGGCTCAGTTTACTAGTGCCATTGTTCAGTGG
TTTTAAGGATACCCCTCACCCGAGTCCGGCAAGAGGACCGAGTCAAATGATCACGGTAACCAAGTCACC
K F L W E W A S A R F S W L S L L V P F V Q W>

```

FIGURE 8

```

      640      650      660      670      680      690      700
      *      *      *      *      *      *      *
TTCGTAGGGGCTTTCCCCCACTGTTTGGGCTTTCAAGTTATATGGATGATGTGGTATTGGGGGCCAAGTCTGT
AAGCATCCCGAAAGGGGGTGACAAACCGAAAGTCAATATACCTACTACACCATAACCCCGGTTCCAGACA
  F  V  G  L  S  P  T  V  W  L  S  V  I  W  M  M  W  Y  W  G  P  S  L>

      710      720      730      740      750      760      770
      *      *      *      *      *      *      *
ACAGCATCTTGGAGTCCCTTTTACCSCGTGTACCAATTTTCTTTTGTCTTTGGGTATACATTAAACCCCT
TGTCGTAGAAGCTCAGGGGAAAGATGGCGACAATGGTTAAAGAGAAACAGAAACCCATATGTAAATTTGGGA
  Y  S  I  L  S  P  F  L  P  L  L  P  I  F  F  C  L  W  V  Y  I  *>

      780      790      800
      *      *      *
AACAAAAAAGAGATGGGGTTACTCTCTAA
TTGTTTTGTTTCTCTACCCCAATGAGAGATT

```

FIGURE 8 CONTINUED

【図9】

```

      10      20      30      40      50      60      70
      *      *      *      *      *      *      *
GCTAGCGCGCGCCACCATGCCAGGGGGTCTAGAAGCCCTCAGAGCCCTGCTCTCTCTCTCTCTCAT
CGATCGCGCGGGTGGTACGGTCCCCCAGATCTTCGGGAGTCTCGGGACGGAGAGCAGGAGAAGAACAGTA
      M P G G L E A L R A L P L L L F L S>

      80      90      100     110     120     130     140
      *      *      *      *      *      *      *
ACGCCCTGTTTGGGTCCCGGATGCCAGGCCATCAGCCAGGCTGTGCACGGCCGCTCAGGCCGAAATCAACGA
TGCGGACAAACCCAGGGGCTACGGTCCCGTAGTCCGTCCGACACGTGCGGGGAGTCCGGCTTTAGTTGCT
Y A C L G P G C Q A I S Q A V H A A H A E I N E>

      150     160     170     180     190     200     210
      *      *      *      *      *      *      *
AGCTGGAAGAACCCCTCCAGCTTATCGCCCTCCAAACGCTCTATCTCTGTTCTTTCTGCTGACCAGATC
TGGACCTTCTTCGGGAGGTCCGAATAGCGGGAGGTTTGGGAGGATAGGACAAAGAGAGTGGTCTTAG
A G R T P P A Y R P P N A P I L F F L L T R I>

      220     230     240     250     260     270     280
      *      *      *      *      *      *      *
CTGACAATCCCCCACTCCCTGGAGCCCAAGTTCTGTGGCTGGCTGGACCCCTGAAGCCTGCCGCTGGGATCA
GACTGTTAGGGGCTCAGGACCTCGGTTCAAGCACCGACGGACCTGGGACTTCCGACCGGCGACCTAGT
L T I P Q S L D A K F V A A W T L K A A A G I>

      290     300     310     320     330     340     350
      *      *      *      *      *      *      *
TCTTCTGTTTCTGTGCAGTGGTGGCAGGACCGCTGCTGCTATTTCAGGAAACGGTGGCAAAATGAGAAGTT
AGAACGACAAGACACGTCAGCACGGTCCCTGGGACGACGATAAGTCTTTTGGCACCGTTTTACTCTTCAA
I L L F C A V V P G T L L L F R K R W Q N E K F>

      360     370     380     390     400     410     420
      *      *      *      *      *      *      *
TGGGGTGGACATGCCAGATCACTATGAAGATGAAAATCTCTATGAGGGCCTGAACCTTGATGACTTTTCT
ACCCACCTGTACGGTCTACTGATACTTCTACTTTTATAGAGATACTCCCGGACTTGGAACTACTGACAAGA
G V D M P D D Y E D E N L Y E G L N L D D C S>

      430     440     450     460     470     480     490
      *      *      *      *      *      *      *
ATGTATGAGGACATCTCCAGGGGACTCCAGGGCACCTACCAGGATGTGGGCAACCTCCACATTGGAGATG
TACAACTCTGTAGAGGTCCCTGAGGTCCCGTGGATGGTCTACACCCGTTGGAGGTGTAAACCTCTAC
M Y E D I S R G L Q G T Y Q D V G N L H I G D>

      500     510
      *      *
CCCAGCTCGAAAAGCCATGACGTACC
GGGTGGACCTTTTCGGTACTCCATGG
A Q L E K F *>

```

FIGURE 9

【図10】

```

      10      20      30      40      50      60      70
      *      *      *      *      *      *      *
GCTAGCGCGCGCCACCATCGCCCACTGGTGCTGTCTTCCATGCCCTGCCACTGGCTGTGTTCCTGCTGC
CGATCGCGCGCGGTGTACCGGTGTGACCACGACAGAAGGTACGGGACGGTGACCGACAACAAGGACGACG
      M A T L V L S S M P C H W L L F L L>

      80      90      100      110      120      130      140
      *      *      *      *      *      *      *
TGCTCTTCTCAGGTGAGCCGATCAGCCAGGCTGTGTCACGCCGCTCAGCGCGAAATCAACGAAGCTGGAAG
ACGAGAAGAGTCCACTCGGCTAGTCCGTCCGACACGTGCGCGAGTCCGGCTTTAGTTGCTTCGACCTTC
L L F S G E P I S Q A V H A A H A E I N E A G R>

      150      160      170      180      190      200      210
      *      *      *      *      *      *      *
AACCCCTCCAGCTTATCGCCCTCCAAACGGCTCCTATCCTGTCTTCTGCTGACCAGAATCCTGACAATC
TTGGGGAGGTCGAATAGCGGAGGTTTCCGAGGATAGGACAAGAAAGACGACTGGTCTTAGGACTTTAG
T P P A Y R P P N A P I L F F L L T R I L T I>

      220      230      240      250      260      270      280
      *      *      *      *      *      *      *
CCCCAGTCCCTGGACGCCAAGTTGCTGCTGCTGGACCCCTGAAGGCTGCCGCTATTATCTTGATCCAGA
GGGCTCAGGGACCTCGCGTTCAAGCAACCGACCGGACCTGGGACTTCCGACGCGGATAATAGAACTAGTCT
P Q S L D A K F V A A W T L K A A A I I L I Q>

      290      300      310      320      330      340      350
      *      *      *      *      *      *      *
CCCTCCTCATCATCTCTTCATCATTTGTCCTCATCTTCTGCTACTTGACAAGGATGACGGCAAGGCTGG
GGGAGGAGTAGTAGGAGAAGTAGTAACACCGGTAGAAGGACGATGAAGTGTCTTCTACTCGCGTTCCGACC
T L L I I L F I I V P H F L L L D K D D G K A G>

      360      370      380      390      400      410      420
      *      *      *      *      *      *      *
GATCGAGGAAGATCACACCTATGAGGGCTTCAACATTGACCAGACAGCCACCTATGAAGACATAGTGACT
CTACCTCCTTCTAGTGTGGATACTCCGAACTTGTAACTGGTCTGTGGTGGATACTTCTGTATCACTGA
M E E D H T Y E G L N I D Q T A T Y E D I V T>

      430      440      450      460      470      480
      *      *      *      *      *      *
CTTCGGACAGGGGAGGTAAAGTGGTCCGTAGGAGAGCATCCAGGCCAGGAATGAGGTACC
GAAGCCTGTCCCGTCCATTTCCACGACCATCTCTCGTAGGTCCGGTCCCTTACTCCATCG
L R T G E V K W S V G E H P G Q E *>

```

FIGURE 10

【図11】

```

      10      20      30      40      50      60      70
      *      *      *      *      *      *      *
OCTAGCGCGCCACCATCGGAATGCAGGTGCAGATCCAGAGCCTGTTTCTGCTCCTCCTGTGGGTGCCCCG
CGATCGCGCGCGGTGGTACCGTTACGTCCACGTCTAGGTCTCCGACAAAGACGAGGAGGACACCCACGGGC
      M G M Q V Q I Q S L F L L L L W V P>

      80      90      100      110      120      130      140
      *      *      *      *      *      *      *
GGTCCCGAGGAATCAGCCAGGCTGTGCACGCGCGCTCAGCCCGAAATCAACGAAGCTCGAAGAACCCTCC
CCAGGGCTCCTTAGTCCGTCCGACAGTGCAGCGAGTGCGGCTTTAGTTGCTTGGACCTTCTTGGGGAGG
G S R G I S Q A V H A A H A E I N E A G R T P P>

      150      160      170      180      190      200      210
      *      *      *      *      *      *      *
AGCTTATCGCCCTCCAAACGCTCCTATCCTGTTCTTTCTGCTGACCAGAATCCTGACAAATCCCCCAGTCC
TCGAATAGCGGGAGGTTTGGGAGGATAGGACAAGAAAGACGACTCGTCTTAGGACTGTTAGGGGGTCAGG
A Y R P P N A P I L F F L L T R I L T I P Q S>

      220      230      240      250      260
      *      *      *      *      *
CTGGACGCCAAGTTCTGTGGCTGCCTGGACCCCTGAAGGCTGCGGCTTGAGGTACC
GACCTGCGGTTCAAGCACCGACGGACCTCGGACTTCCGACGGCGGAACCTCCATGG
L D A K F V A A W T L K A A A *>

```

FIGURE 11

【図12】

TTCCCAG	ATG	CAC	AGG	AGG	AGA	AGC	AGG	AGC	TGT	CGG	GAA	GAT	CAG	AAG	49	
	Met	His	Arg	Arg	Arg	Ser	Arg	Ser	Cys	Arg	Glu	Asp	Gln	Lys		
	1				5				10							
CCA	GTC	ATG	GAT	GAC	CAG	CGC	GAC	CTT	ATC	TCC	AAC	AAT	GAG	CAA	CTG	97
	Pro	Val	Met	Asp	Asp	Gln	Arg	Asp	Leu	Ile	Ser	Asn	Asn	Glu	Gln	Leu
	15				20				25					30		
CCC	ATG	CTG	GGC	CGG	CGC	CCT	GGG	GCC	CCG	GAG	AGC	AAG	TGC	AGC	CGC	145
	Pro	Met	Leu	Gly	Arg	Arg	Pro	Gly	Ala	Pro	Glu	Ser	Lys	Cys	Ser	Arg
				35				40					45			
GGA	GCC	CTG	TAC	ACA	GGC	TTT	TCC	ATC	CTG	GTG	ACT	CTG	CTC	CTC	GCT	193
	Gly	Ala	Leu	Tyr	Thr	Gly	Phe	Ser	Ile	Leu	Val	Thr	Leu	Leu	Ala	
			50				55						60			
GGC	CAG	GCC	ACC	ACC	GCC	TAC	TTC	CTG	TAC	CAG	CAG	CAG	GGC	CGG	CTG	241
	Gly	Gln	Ala	Thr	Thr	Ala	Tyr	Phe	Leu	Tyr	Gln	Gln	Gln	Gly	Arg	Leu
			65				70					75				
GAC	AAA	CTG	ACA	GTC	ACC	TCC	CAG	AAC	CTG	CAG	CTG	GAG	AAC	CTG	CGC	289
	Asp	Lys	Leu	Thr	Val	Thr	Ser	Gln	Asn	Leu	Gln	Leu	Glu	Asn	Leu	Arg
		80				85				90						
ATG	AAG	CTT	CCC	AAG	CCT	CCC	AAG	CCT	GTG	AGC	AAG	ATG	CGC	ATG	GCC	337
	Met	Lys	Leu	Pro	Lys	Pro	Pro	Lys	Pro	Val	Ser	Lys	Met	Arg	Met	Ala
		95			100				105					110		
ACC	CCG	CTG	CTG	ATG	CAG	GCG	CTG	CCC	ATG	GGA	GCC	CTG	CCC	CAG	GGG	385
	Thr	Pro	Leu	Leu	Met	Gln	Ala	Leu	Pro	Met	Gly	Ala	Leu	Pro	Gln	Gly
				115				120					125			
CCC	ATG	CAG	AAT	GCC	ACC	AAG	TAT	GGC	AAC	ATG	ACA	GAG	GAC	CAT	GTG	433
	Pro	Met	Gln	Asn	Ala	Thr	Lys	Tyr	Gly	Asn	Met	Thr	Glu	Asp	His	Val
			130					135					140			
ATG	CAC	CTG	CTC	CAG	AAT	GCT	GAC	CCC	CTG	AAG	GTG	TAC	CCG	CCA	CTG	481
	Met	His	Leu	Leu	Gln	Asn	Ala	Asp	Pro	Leu	Lys	Val	Tyr	Pro	Pro	Leu
			145				150					155				
AAG	GGG	AGC	TTC	CCG	GAG	AAC	CTG	AGA	CAC	CTT	AAG	AAC	ACC	ATG	GAG	529
	Lys	Gly	Ser	Phe	Pro	Glu	Asn	Leu	Arg	His	Leu	Lys	Asn	Thr	Met	Glu
		160				165					170					
ACC	ATA	GAC	TGG	AAG	GTC	TTT	GAG	AGC	TGG	ATG	CAC	CAT	TGG	CTC	CTG	577
	Thr	Ile	Asp	Trp	Lys	Val	Phe	Glu	Ser	Trp	Met	His	His	Trp	Leu	Leu
		175				180				185					190	

FIGURE 12

【図12-1】

TTT GAA ATG AGC AGG CAC TCC TTG GAG CAA AAG CCC ACT GAC GGT CCA	625
Phe Glu Met Ser Arg His Ser Leu Glu Gln Lys Pro Thr Asp Ala Pro	
195 200 205	
CCG AAA GAG TCA CTG GAA CTG GAG GAC CCG TCT TCT GGG CTG GGT GTG	673
Pro Lys Glu Ser Leu Glu Leu Glu Asp Pro Ser Ser Gly Leu Gly Val	
210 215 220	
ACC AAG CAG GAT CTG GGC CCA GTC CCC ATG TGAGAGCAGC AGAGGCGGTC	723
Thr Lys Gln Asp Leu Gly Pro Val Pro Met	
225 230	

FIGURE 12 Continued

【図13】

COGCCTCGGC	ATG	GCG	CCC	CGC	AGC	GCC	CGG	CGA	CCC	CTG	CTG	CTG	CTA	229
	Met	Ala	Pro	Arg	Ser	Ala	Arg	Arg	Pro	Leu	Leu	Leu	Leu	
	1				5					10				
CTG	CCT	GTT	GCT	GCT	GCT	CGG	CCT	CAT	GCA	TTG	TGG	TCA	GCA	277
Leu	Pro	Val	Ala	Ala	Ala	Arg	Pro	His	Ala	Leu	Ser	Ser	Ala	
	15					20				25				
TTT	ATG	GTG	AAA	AAT	GCG	AAC	GGG	ACC	GCG	TGC	ATA	ATG	GCC	325
Phe	Met	Val	Lys	Asn	Gly	Asn	Gly	Thr	Ala	Cys	Ile	Met	Ala	
	30				35				40				45	
TCT	GCT	GCC	TTC	TCA	GTG	AAC	TAC	GAC	ACC	AAG	AGT	GGC	CCC	373
Ser	Ala	Ala	Phe		Ser	Val	Asn	Tyr	Asp	Thr	Lys	Ser	Gly	
				50					55				60	
ATG	ACC	TTT	GAC	CTG	CCA	TCA	GAT	GCC	ACA	GTG	GTG	CTC	AAC	421
Met	Thr	Phe	Asp	Leu	Pro	Ser	Asp	Ala	Thr	Val	Val	Leu	Asn	
				65				70					75	
TCC	TGT	GGA	AAA	GAG	AAC	ACT	TCT	GAC	CCC	AGT	CTC	GTG	ATT	469
Ser	Cys	Gly	Lys	Glu	Asn	Thr	Ser	Asp	Pro	Ser	Leu	Val	Ile	
		80					85					90		
GGA	AGA	GGA	CAT	ACA	CTC	ACT	CTC	AAT	TTC	ACG	AGA	AAT	GCA	517
Gly	Arg	Gly	His	Thr	Leu	Thr	Leu	Asn	Phe	Thr	Arg	Asn	Ala	
	95					100					105			
TAC	AGC	GTT	CAG	CTC	ATG	AGT	TTT	GTT	TAT	AAC	TTG	TCA	GAC	565
Tyr	Ser	Val	Gln	Leu	Met	Ser	Phe	Val	Tyr	Asn	Leu	Ser	Asp	
	110					115				120				125
GTT	TTC	CCC	AAT	GCG	AGC	TCC	AAA	GAA	ATC	AAG	ACT	GTG	GAA	613
Leu	Phe	Pro	Asn	Ala	Ser	Ser	Lys	Glu	Ile	Lys	Thr	Val	Glu	
				130				135					140	
ACT	GAC	ATC	AGG	GCA	GAT	ATA	GAT	AAA	AAA	TAC	AGA	TGT	GTT	661
Thr	Asp	Ile	Arg	Ala	Asp	Ile	Asp	Lys	Lys	Tyr	Arg	Cys	Val	
			145					150					155	
ACC	CAG	GTC	CAC	ATG	AAC	AAC	GTG	ACC	GTA	ACG	CTC	CAT	GAT	709
Thr	Gln	Val	His	Met	Asn	Asn	Val	Thr	Val	Thr	Leu	His	Asp	
			160				165					170		
ATC	CAG	GCG	TAC	CTT	TCC	AAC	AGC	AGC	TTC	AGC	AGG	GGA	GAG	757
Ile	Gln	Ala	Tyr	Leu	Ser	Asn	Ser	Ser	Phe	Ser	Arg	Gly	Glu	
	175					180					185			

FIGURE 13

【図13-1】

TGT GAA CAA GAC AGG CCT TCC CCA ACC ACA GCG CCC CCT GCG CCA CCC Cys Glu Gln Asp Arg Pro Ser Pro Thr Thr Ala Pro Pro Ala Pro Pro 190 195 200 205	805
AGC CCC TCG CCC TCA CCC GTG CCC AAG AGC CCC TCT GTG GAC AAG TAC Ser Pro Ser Pro Ser Pro Val Pro Lys Ser Pro Ser Val Asp Lys Tyr 210 215 220	853
AAC GTG AGC GGC ACC AAC GGG ACC TGC CTG CTG GCC AGC ATG GGG CTG Asn Val Ser Gly Thr Asn Gly Thr Cys Leu Leu Ala Ser Met Gly Leu 225 230 235	901
CAG CTG AAC CTC ACC TAT GAG AGG AAG GAC AAC ACG ACG GTG ACA AGG Gln Leu Asn Leu Thr Tyr Glu Arg Lys Asp Asn Thr Thr Val Thr Arg 240 245 250	949
CTT CTC AAC ATC AAC CCC AAC AAG ACC TCG GCC AGC GGG AGC TGC GGC Leu Leu Asn Ile Asn Pro Asn Lys Thr Ser Ala Ser Gly Ser Cys Gly 255 260 265	997
GCC CAC CTG GTG ACT CTG GAG CTG CAC AGC GAG GGC ACC ACC GTC CTG Ala His Leu Val Thr Leu Glu Leu His Ser Glu Gly Thr Thr Val Leu 270 275 280 285	1045
CTC TTC CAG TTC GGG ATG AAT GCA AGT TCT AGC CGG TTT TTC CTA CAA Leu Phe Gln Phe Gly Met Asn Ala Ser Ser Ser Arg Phe Phe Leu Gln 290 295 300	1093
GGA ATC CAG TTG AAT ACA ATT CTT CCT GAC GCC AGA GAC CCT GCC TTT Gly Ile Gln Leu Asn Thr Ile Leu Pro Asp Ala Arg Asp Pro Ala Phe 305 310 315	1141
AAA GCT GCC AAC GGC TCC CTG CGA GCG CTG CAG GCC ACA GTC GGC AAT Lys Ala Ala Asn Gly Ser Leu Arg Ala Leu Gln Ala Thr Val Gly Asn 320 325 330	1189
TCC TAC AAG TCC AAC GCG GAG GAG CAC GTC CGT GTC ACG AAG GCG TTT Ser Tyr Lys Cys Asn Ala Glu Glu His Val Arg Val Thr Lys Ala Phe 335 340 345	1237
TCA GTC AAT ATA TTC AAA GTG TGG GTC CAG GCT TTC AAG GTG GAA GGT Ser Val Asn Ile Phe Lys Val Trp Val Gln Ala Phe Lys Val Glu Gly 350 355 360 365	1285
GGC CAG TTT GGC TCT GTG GAG GAG TGT CTG CTG GAC GAG AAC AGC ACG Gly Gln Phe Gly Ser Val Glu Glu Cys Leu Leu Asp Glu Asn Ser Thr 370 375 380	1333

FIGURE 13. CONTINUED

【図13-2】

CTG ATC CCC ATC GCT GTG GGT GGT GCC CTG GCG GGG CTG GTC CTC ATC	1381
Leu Ile Pro Ile Ala Val Gly Gly Ala Leu Ala Gly Leu Val Leu Ile	
385 390 395	
GTG CTC ATC GCC TAC CTC GTC GGC AGG AAG AGG AGT CAC GCA GGC TAC	1429
Val Leu Ile Ala Tyr Leu Val Gly Arg Lys Arg Ser His Ala Gly Tyr	
400 405 410	
CAG ACT ATC TAGCCTGGTG CACGCAGGCA CAGCAGCTGC AGGGGCCTCT	1478
Gln Thr Ile	
415	

FIGURE 13 CONTINUED

【図14】

```

      10      20      30      40      50      60      70
      *      *      *      *      *      *      *
ATGATCACATTCTGCGCGCTGCTGCTGGGGCTCAGCCTGGGCTGCACAGGAGCAGGTGGCTTCGTGGCCC
TACTAGTGTAAAGGACGGCGACGACGCCCGAGTCCGACCCGACGTGTCCTCCACCGAAGCACCAGG
M I T F L P L L L G L S L G C T G A G G F V A>

      80      90      100     110     120     130     140
      *      *      *      *      *      *      *
ATGTGGAAAGCACCTGTCTGTTGGATGATGCTGGGACTCCAAAGGATTTCACATACTGCATCTCCTTCAA
TACACCTTTTCGTGGACAGACAACCTACTACGACCTGAGGTTTCCTAAAGTGTATGACGTAGAGGAAGTT
H V E S T C L L D D A G T P K D F T Y C I S F N>

      150     160     170     180     190     200     210
      *      *      *      *      *      *      *
CAAGGATCTGCTGACCTGCTGGGATCCAGAGGAGAATAAGATGGCCCTTGCGAATTTGGGGTGTCTGAAT
GTTCTAGACGACTGGACGACCTAGGTCTCCTCTTATCTACCGGGGAACGCTTAAACCCACGACTTA
K D L L T C W D P E E N K M A P C E F G V L N>

      220     230     240     250     260     270     280
      *      *      *      *      *      *      *
AGCTTGGCGAATGTCCTCTCACAGCACCTCAACCAAAAAGACACCCTGATGCAGCGCTTGCAGCAATGGGC
TCGAACCGCTTACAGGAGAGTGTGCTGGAGTTGGTTTTCTGTGGGACTACGTCCGGAACCGCTTACCCG
S L A N V L S Q H L N Q K D T L M Q R L R N G>

      290     300     310     320     330     340     350
      *      *      *      *      *      *      *
TTCAGAATTGTGCCACACACACCCAGCCCTTCTGGGGATCACTGACCAACAGGACACGGCCACCATCTGT
AAGTCTTTAACACCGGTGTGTGTGGGTGCGGAAGACCCCTAGTGACTGGTTGTCTGTGCCGGTGGTAGACA
L Q N C A T E T Q P F W G S L T N R T R P P S V>

      360     370     380     390     400     410     420
      *      *      *      *      *      *      *
GCAAGTAGCCAAAACCACTCTTTTAAACAGAGGGAGCCTGTGATGCTGGCCTGCTATGTGTGGGGCTTC
CGTTCTATCGGTTTTTGGTGAGGAAAATTGTGCTCCCTCGGACACTACGACCGGACGATACACACCCCGAAG
Q V A K T T P F N T R E P V M L A C Y V W G F>

      430     440     450     460     470     480     490
      *      *      *      *      *      *      *
TATCCAGCAGAAGTGACTATCACGTGGAGGAAGAACGGGAAGCTTGTGATGCCTCACAGCAGTCCGCACA
ATAGSTCGTCTTCACTGATAGTGACCTCCTTCTTGGCCCTTCAACAGTACGGAGTGTGCTCACGGCTGT
Y P A E V T I T W R K N G K L V M P H S S A H>

      500     510     520     530     540     550     560
      *      *      *      *      *      *      *
AGACTGCCAGCCCAATGGAGACTGGACATACAGACCCCTCTCCATTAGCCTTAACCCCTCTTACGG
TCTGACGGGTGCGGTTACCTCTGACCTGTATGGTCTGGGAGAGGGTAAATCGGAATTGGGGGAGAATGCC
K T A Q P N G D W T Y Q T L S H L A L T P S Y G>

```

FIGURE 14

【図14-1】

```

      570      580      590      600      610      620      630
      *      *      *      *      *      *      *
GGACACTTACACCTGTCTGGTAGAGCACATTGGGGCTCCTGAGCCCATCCTTCGGGACTGGACACCTGGG
CCTGTGAATGTGGACACACCATCTCGTGTAAACCCGAGGACTCGGGTAGGAAGCCCTGACCTGTGGACCC
D T Y T C V V E H I G A P E P I L R D W T P G>

      640      650      660      670      680      690      700
      *      *      *      *      *      *      *
CTGTCCCCCATGCAGACCCTGAAGGTTTCTGTGTCTGCACTGACTCTGGGCCTGGGCCTCATCATCTTCT
GACAGGGGGTACGTCTGGGACTTCCAAAGACACAGACGTCACCTGAGACCCGGACCCGGAGTAGTAGAAGA
L S P M Q T L K V S V S A V T L G L G L I I F>

      710      720      730      740      750      760      770
      *      *      *      *      *      *      *
CTCTTGGTGTGATCAGCTGGCGGAGAGCTGGCCACTCTAGTTACACTCCTCTTCCTGGGTCCCAATTATTC
GAGAACCACACTAGTCGACCCGCTCTCGACCGGTGAGATCAATGTGAGGAGAAGGACCCAGGTTAATAAG
S L G V I S W R R A G H S S Y T P L P G S N Y S>

      780      790
      *      *      *      *
AGAAGGATGGCACATTTCCTAG
TCTTCCCTACCGTGTAAGGATC
E G W H I S *>

```

FIGURE 14 Continued

【図15】

```

      10      20      30      40      50      60      70
      *      *      *      *      *      *      *
ATGGGTTCTGGGTGGGTCCCTGGGTGGTGGCTCTGCTAGTGAATCTGACCCAACTGGATTCCCTCCATGA
TACCCCAAGACCCACCCAGGGGACCCACCCACCGAGACGATCACTTAGACTGGGTTGACCTAAGGAGGTACT
M G S G W V P W V V A L L V N L T Q L D S S M>

      80      90      100     110     120     130     140
      *      *      *      *      *      *      *
CTCAAGGCACAGACTCTCCAGAAGATTTTGTGATTCAGGCAAAGGCTGACTGTTACTTCACCAACGGGAC
GAGTTCCGTGTCTGAGAGGTCTTCTAAAACACTAAGTCCGTTTCCGACTGACAATGAAGTGGTTGCCCTG
T Q G T D S P E D F V I Q A K A D C Y F T N G T>

      150     160     170     180     190     200     210
      *      *      *      *      *      *      *
AGAAAGGTGCAGTTTGTGGTCAGATTCACTTTAACTTGGAGGAGTATGTACGTTTCGACAGTGAATGTG
TCTTTTCCACGTCAAACACCACTCTAAGTAGAAATTGAACCTCCTCATACATGCAAAGCTGTCACTACAC
E K V Q F V V R F I F N L E E Y V R F D S D V>

      220     230     240     250     260     270     280
      *      *      *      *      *      *      *
GGGATGTTTGTGGCATTGACCAAGCTGGGGCAGCCAGATGCTGAGCAGTGGAAACAGCCGGCTGGATCTCT
CCCTACAAACACCGTAACTGTTTCGACCCCGTCGGTCTACGACTCGTCACCTTGTCCGGCCGACCTAGAGA
G M F V A L T K L G Q P D A E Q W N S R L D L>

      290     300     310     320     330     340     350
      *      *      *      *      *      *      *
TGGAGAGGAGCAGACAGGCCGTGGATGGGGTCTGTAGACACAACCTACAGGCTGGGGCGCACCCCTTCACTGT
ACCTCTCCTCGTCTGTCCGGCACCTACCCAGACATCTGTGTTGATGTCCGACCCCGGTGGGAAGTGACA
L E R S R Q A V D G V C R H N Y R L G A P F T V>

      360     370     380     390     400     410     420
      *      *      *      *      *      *      *
GGGGAGAAAGTGCACCAGAGGTGACAGTGTACCCAGAGAGGACCCCACTCCTGCACCAGCATATCTG
CCCTCTTTTTCACGTTGGTCTCCACTGTACATGGGTCTCTCCTGGGGTGAGGACGTGGTCGTATTAGAC
G R K V Q P E V T V Y P E R T P L L H Q H N L>

      430     440     450     460     470     480     490
      *      *      *      *      *      *      *
CTGCACTGCTCTGTGACAGGCTTCTATCCAGGGGATATCAAGATCAAGTGGTTCTGAAATGGGCAGGAGG
GACGTGACGAGACACTGTCCGAAGATAGGTCCCTATAGTTCTAGTTTACCAAGGACTTACCCGTCCTCC
L H C S V T G F Y P G D I K I K W F L N G Q E>

      500     510     520     530     540     550     560
      *      *      *      *      *      *      *

```

FIGURE 15

【図15-1】

```

AGAGAGCTGGGGTCAIGTCCACTGGCCCTATCAGGAATGGAGACTGGACCTTTCAGACTGTGGTGATGCT
TCTCTCGACCCCACTACAGGTGACCGGGATAGTCCTTACCTCTGACCTGGAAAGTCTGACACCACTACGA
E R A G V M S T G P I R N G D W T F Q T V V M L>

      570      580      590      600      610      620      630
      *      *      *      *      *      *      *
AGAAATGACTCCTGAACTTGGACATGTCTACACCTGCCTTGTCTGATCACTCCAGCCTGCTGAGCCCTGTT
TCTTTACTGAGGACTTGAACCTGTACAGATGTGGACGGAACAGCTAGTGAGGTGCGACGACTCGGGACAA
E M T P E L G H V Y T C L V D H S S L L S P V>

      640      650      660      670      680      690      700
      *      *      *      *      *      *      *
TCTGTGGAGTGGAGAGCTCAGTCTGAATATTCTTGGAGAAAGATGCTGAGTGGCATTGCAGCCTTCCTAC
AGACACCTCACCCTCTCGAGTCAGACTTATAAGAACCTCTTCTACGACTCACCGTAACGTCCGAAGGATG
S V E W R A Q S E Y S W R K M L S G I A A F L>

      710      720      730      740      750      760      770
      *      *      *      *      *      *      *
TTGGGCTAATCTTCCTTCTGGTGGGAATCGTCATCCAGCTAAGGGCTCAGAAAGGATATGTGAGGACGCA
AACCCGATTAGAAGGAAGACCACCCCTTAGCAGTAGGTGCGATTCCCGAGTCTTTCCTATACACTCCTGCGT
L G L I F L L V G I V I Q L R A Q K G Y V R T Q>

      780      790      800      810      820
      *      *      *      *      *
GATGTCTGGTAATGAGGTCTCAAGAGCTGTTCTGCTCCCTCAGTCATGCTAA
CTACAGACCATTACTCCAGAGTTCTCGACAAGACGAGGGAGTCAGTACGATT
M S G N E V S R A V L L P Q S C*>

```

FIGURE 15 CONTINUED

【図16】

```

      10      20      30      40      50      60      70
      *      *      *      *      *      *      *
ATGCCTGGGGGTCCAGGAGTCCTCCAAGCTCTGCCTGCCACCATCTTCCTCCTCTCTCTGCTGTCTGCTG
TACGGACCCCCAGGTCTCTCAGGAGGTTTCGAGACGGACGGTGGTAGAAGGAGGAGAAGGACGACAGACGAC
M P G G P G V L Q A L P A T I F L L F L L S A>

      80      90      100     110     120     130     140
      *      *      *      *      *      *      *
TCTACCTGGGCCCCTGGGTGCCAGGCCCTGTGGATGCACAAGGTCCCAGCATCATTGATGGTGAGCCTGGG
AGATGGACCCCGGGACCCACGGTCCGGGACACCTACGTGTTCCAGGGTCGTAGTAACCTACCACTCGGACCC
V Y L G P G C Q A L W M H K V P A S L M V S L G>

      150     160     170     180     190     200     210
      *      *      *      *      *      *      *
GGAAGACGCCCACTTCCAATGCCCGCACATAAGCAGCAACAACGCCACGTACACCTGGTGGCGCGTCCCTC
CCTTCTGCGGGTGAAGGTTACGGGCGTGTATTATCGTCGTTGTTGCGGTTGCAGTGGACACCCGCGCAGGAG
E D A H F Q C P H N S S N N A N V T W W R V L>

      220     230     240     250     260     270     280
      *      *      *      *      *      *      *
CATGGCAACTACACGTGGCCCCCTGAGTTCTTGGGCCCGGGCGAGGACCCCAATGGTACGCTGATCATCC
GTACCGTTTGATGTGCACCCGGGGACTCAAGAACCCGGGCCCCGCTCCTGGGGTTACCATGCGACTAGTAGG
H G N Y T W P P E F L G P G E D P N G T L I I>

      290     300     310     320     330     340     350
      *      *      *      *      *      *      *
AGAATGTGAACAAGAGCCATGGGGGCATATACGTGTGCCGGGTCCAGGAGGGCAACGAGTCATACCAGCA
TCTTACACTTGTCTCGGTACCCCCGTATATGCACACGGCCAGGTCTCCCGTTGCTCAGTATGGTCTGT
Q N V N K S H G G I Y V C R V Q E G N E S Y Q Q>

      360     370     380     390     400     410     420
      *      *      *      *      *      *      *
GTCCTGCGGCACCTACCTCCGCGTGCGCCAGCCGCCCCCAGGCCCTTCCTGGACATGGGGAGGGCACC
CAGGACCGCGTGGATGGAGGCGCACGCGGTGCGCGGGGGTCCGGGAAGGACCTGTACCCCTCCCGTGG
S C G T Y L R V R Q P P P R P F L D M G E G T>

      430     440     450     460     470     480     490
      *      *      *      *      *      *      *
AAGAACCGAATCATCACACCCGAGGGGATCATCCTCCTGTTCTGCGCGGTGGTGCCTGGGACGCTGCTGC
TTCTTGGCTTAGTAGTGTGGCTCCCCCTAGTAGGAGGACAAGACGCGCCACCACGGACCCCTGCGACGACG
K N R I I T A E G I I L L F C A V V P G T L L>

```

FIGURE 16

【図16-1】

```

      500      510      520      530      540      550      560
      *      *      *      *      *      *      *
TGTT CAGGAAACGATGGCAGAACGAGAAGCTCGGGTTGGATGCCGGGGATGAATATGAAGATGAAAACCT
ACAAAGTCCTTTGCTACCGTCTTGCTCTTCGAGCCCCAACCTACGGCCCCTACTTATACTTCTACTTTTGA
L F R K R W Q N E K L G L D A G D E Y E D E N L>

      570      580      590      600      610      620      630
      *      *      *      *      *      *      *
TTATGAAGGCCTGAACCTGGACGACTGCTCCATGTATGAGGACATCTCCCGGGGCCTCCAGGGCACCTAC
AATACITCCGGACTTGGACCTGCTGACGAGGTACATACTCCTGTAGAGGGCCCCGGAGGTCCCGTGGATG
Y E G L N L D D C S M Y E D I S R G L Q G T Y>

      640      650      660      670      680      690      700
      *      *      *      *      *      *      *
CAGGATGTGGGCAGCCTCAACATAGGAGATGTCCAGCTGGAGAAGCCGTGACACCCCTACTCCTGCCAGG
GTCCTACACCCCGTCGGAGTTGTATCCTCTACAGGTCGACCTCTTCGGCACTGTGGGGATGAGGACGGTCC
Q D V G S L N I G D V Q L E K P *>

```

FIGURE 16 CONTINUED

【図17】

GAATTCGCG GTGACC ATG GCC AGG CTG GCG TTG TCT CCT GTG CCC AGC	49
Met Ala Arg Leu Ala Leu Ser Pro Val Pro Ser	
1 5 10	
CAC TGG ATG GTG GCG TTG CTG CTG CTG CTC TCA GCT GAG CCA GTA CCA	97
His Trp Met Val Ala Leu Leu Leu Leu Ser Ala Glu Pro Val Pro	
15 20 25	
GCA GCC AGA TCG GAG GAC CGG TAC CGG AAT CCC AAA GGT AGT GCT TGT	145
Ala Ala Arg Ser Glu Asp Arg Tyr Arg Asn Pro Lys Gly Ser Ala Cys	
30 35 40	
TCG CGG ATC TGG CAG AGC CCA CGT TTC ATA GCC AGG AAA CGG CGC TTC	193
Ser Arg Ile Trp Gln Ser Pro Arg Phe Ile Ala Arg Lys Arg Arg Phe	
45 50 55	
ACG GTG AAA ATG CAC TGC TAC ATG AAC AGC GCC TCC GGC AAT GTG AGC	241
Thr Val Lys Met His Cys Tyr Met Asn Ser Ala Ser Gly Asn Val Ser	
60 65 70 75	
TGG CTC TGG AAG CAG GAG ATG GAC GAG AAT CCC CAG CAG CTG AAG CTG	289
Trp Leu Trp Lys Gln Glu Met Asp Glu Asn Pro Gln Gln Leu Lys Leu	
80 85 90	
GAA AAG GGC CGC ATG GAA GAG TCC CAG AAC GAA TCT CTC GCC ACC CTC	337
Glu Lys Gly Arg Met Glu Glu Ser Gln Asn Glu Ser Leu Ala Thr Leu	
95 100 105	
ACC ATC CAA GGC ATC CGG TTT GAG GAC AAT GGC ATC TAC TTC TGC CAG	385
Thr Ile Gln Gly Ile Arg Phe Glu Asp Asn Gly Ile Tyr Phe Cys Gln	
110 115 120	
CAG AAG TGC AAC AAC ACC TCG GAG GTC TAC CAG GGC TGC GGC ACA GAG	433
Gln Lys Cys Asn Asn Thr Ser Glu Val Tyr Gln Gly Cys Gly Thr Glu	
125 130 135	
CTG CGA GTC ATG GGA TTC AGC ACC TTG GCA CAG CTG AAG CAG AGG AAC	481
Leu Arg Val Met Gly Phe Ser Thr Leu Ala Gln Leu Lys Gln Arg Asn	
140 145 150 155	
ACG CTG AAG GAT GGT ATC ATC ATG ATC CAG ACG CTG CTG ATC ATC CTC	529
Thr Leu Lys Asp Gly Ile Ile Met Ile Gln Thr Leu Leu Ile Ile Leu	
160 165 170	

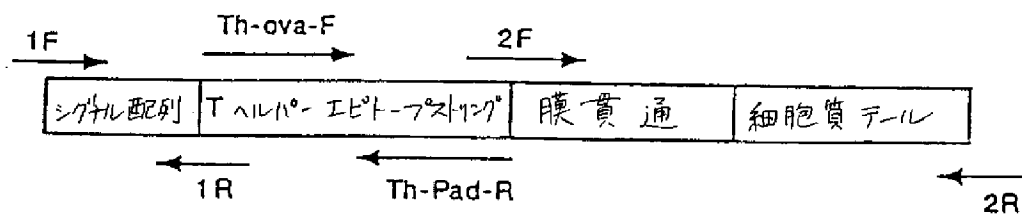
FIGURE 17

【図17-1】

TTC ATC ATC GTG CCT ATC TTC CTG CTG CTG GAC AAG GAT GAC AGC AAG	577
Phe Ile Ile Val Pro Ile Phe Leu Leu Leu Asp Lys Asp Asp Ser Lys	
175 180 185	
GCT GGC ATG GAG GAA GAT CAC ACC TAC GAG GGC CTG GAC ATT GAC CAG	625
Ala Gly Met Glu Glu Asp His Thr Tyr Glu Gly Leu Asp Ile Asp Gln	
190 195 200	
ACA GCC ACC TAT GAG GAC ATA GTG ACG CTG CGG ACA GGG GAA GTG AAG	673
Thr Ala Thr Tyr Glu Asp Ile Val Thr Leu Arg Thr Gly Glu Val Lys	
205 210 215	
TGG TCT GTA GGT GAG CAC CCA GGC CAG GAG TGAGAGCCAG GTCGCCCCAT	723
Trp Ser Val Gly Glu His Pro Gly Gln Glu	
220 225 230	

FIGURE 17 CONTINUED

【図18】



【図19】

```

      10      20      30      40      50      60      70
*   *   *   *   *   *   *   *   *   *   *   *
GACGGATCGGGAGATCTCCCGATCCCCTATGGTCGACTCTCAGTACAATCTGCTCTGATGCCGCATAGTT
CTGCCCTAGCCCTCTAGAGGGCTAGGGGATACCAGCTGAGAGTCATGTTAGACGAGACTACGGCGTATCAA

      80      90      100     110     120     130     140
*   *   *   *   *   *   *   *   *   *   *   *
AAGCCAGTATCTGCTCCCTGCTTGTGTGTTGGAGGTCGCTGAGTAGTGCGCGAGCAAAATTTAAGCTACA
TTCGGTCATAGACGAGGGACGAACACACAACCTCCAGCGACTCATCAGCGCTCGTTTTAAATTCGATGT

      150     160     170     180     190     200     210
*   *   *   *   *   *   *   *   *   *   *   *
ACAAGGCAAGGCTTGACCGACAATTGCATGAAGAATCTGCTTAGGGTTAGGGCTTTTGCGCTGCTTCGG
TGTTCCGTTCCGAACCTGGCTGTTAACGTACTTCTTAGACGAATCCCAATCCGCAAAACGGCAGCAAGCGC

      220     230     240     250     260     270     280
*   *   *   *   *   *   *   *   *   *   *   *
ATGTACGGGGCAGATATACGCGTTGACATTGATTATTGACTAGTTATTAAATAGTAATCAATTACGGGGTC
TACATGCCCGGTCTATATGCGCAACTGTAACTAATAACTGATCAATAATTATCATTAGTTAATGCCCCAG

      290     300     310     320     330     340     350
*   *   *   *   *   *   *   *   *   *   *   *
ATTAGTTCATAGCCCATATATGGAGTTCGCGGTACATAACTTAACGGTAAATGGCCCGCTGGCTGACCG
TAATCAAGTATCGGGTATATACCTCAAGGCGCAATGTATTGAATGCCATTTACGGGCGGACCGACTGGC

      360     370     380     390     400     410     420
*   *   *   *   *   *   *   *   *   *   *   *
CCCAACGACCCCGCCCACTTACGCTCAATAATGACGTATGTTCCCATAGTAACGCCAATAGGGACTTTCC
GGGTGCTGGGGGGGGTAACTGCAGTTATTACTGCATACAGGGTATCATTGCGGTTATCCCTGAAAGG

      430     440     450     460     470     480     490
*   *   *   *   *   *   *   *   *   *   *   *
ATTGACGTCAATGGGTGGACTATTTACGGTAACTGCCCACTTGGCAGTACATCAAGTGTATCATATGCC
TAACTGCAGTTACCCACCTGATAAATGCCATTTGACGGGTGAACCGTCATGTAGTTCACATAGTATACGG

      500     510     520     530     540     550     560
*   *   *   *   *   *   *   *   *   *   *   *
AAGTACGCCCCCTATTGACGTCAATGACGTAATGGCCCGCTGGCATTATGCCAGTACATGACCTTA
TTCATGCGGGGGATAACTGCAGTTACTGCCATTTACGGGCGGACCGTAATACGGGTCAATGTACTGGAAT

      570     580     590     600     610     620     630
*   *   *   *   *   *   *   *   *   *   *   *
TGGGACTTTTCCTACTTGGCAGTACATCTACGTATTAGTCATCGCTATTACCATGGTGATGCGGTTTGGC
ACCCCTGAAGGATGAACCGTCATGTAGATGCATAATCAGTAGCGATAATGGTACCCTACGCCAAAACCG

      640     650     660     670     680     690     700
*   *   *   *   *   *   *   *   *   *   *   *
AGTACATCAATGGGCGTGGATAGCGGTTTGAATCAGCGGGATTTCCTAAGTCTCCACCCCAATTGACGTCAA
TCATGTAGTTACCCGCACCTATCGCCAACTGAGTGCCCTAAAGGTTACAGAGGTGGGGTAACTGCAGTT

```

FIGURE 19

【図19-1】

```

      710      720      730      740      750      760      770
      *      *      *      *      *      *      *
TGGGAGTTTGTTTTGGCACAAAATCAACGGGACTTTCCAAAATGTCGTAACAACTCGCCCCATTGACG
ACCCCTCAAAACAAAACCGTGGTTTATGTTGCCCTGAAAGGTTTACAGCATTGTTGAGCGGGGTAACGTC

      780      790      800      810      820      830      840
      *      *      *      *      *      *      *
CAAATGGGCGGTAGGCGTGTACGGTGGGAGGTCTATATAAGCAGAGCTCTCTGGCTAACTAGAGAACCCA
GTTTACCCGCCATCCGCACATGCCACCCCTCCAGATATATTCGTCTCGAGAGACCGATTGATCTCTTGGGT

      850      860      870      880      890      900      910
      *      *      *      *      *      *      *
CTGCTTACTGGCTTATCGAAATTAATACGACTCACTATAGGGAGACCCAGCTGGCTAGAGTAAGTACCG
GACGAATGACCGAATAGCTTTAATTATGCTGAGTGATATCCCTCTGGGTTCGACCGATCTCAITCATGGC

      920      930      940      950      960      970      980
      *      *      *      *      *      *      *
CCTATAGAGTCTATAGGCCACCCCTTGGCTTCTTATGCATGCTATAGTGTGCTTGGGCTCTAT
GGATATCTCAGATATCCGGGTGGGGGAACCGAAGATACTACGATATGACAAAAACCGAACCCAGATA

      990     1000     1010     1020     1030     1040     1050
      *      *      *      *      *      *      *
ACACCCCGGCTTCTCATGTTATAGGTGATGGTATAGCTTAGCCTATAGGTGTGGGTTATTGACCATTAT
TGTGGGGGCGAAGGAGTACAAATATCCACTACCATATCGAATCGGATATCCACACCCAATAACTGGTAATA

      1060     1070     1080     1090     1100     1110     1120
      *      *      *      *      *      *      *
TGACCACTCCCGCTATTGGTGACGATACTTTCCATTACTAATCCATAACATGGCTCTTTGCCACAACCTCTC
ACTGGTGAGGGGATAACCACTGCTATGAAAGGTAATGATTAGGTATTGTACCGAGAAACGGTGTGAGAG

      1130     1140     1150     1160     1170     1180     1190
      *      *      *      *      *      *      *
TTTATTGGCTATATGCCAATACACTGTCTTCAGAGACTGACACGGACTCTGTATTTTACAGGATGGGG
AAATAACCGATATACGGTTATGTGACAGGAAGTCTCTGACTGTGCCTGAGACATAAAAAATGTCTACCCC

      1200     1210     1220     1230     1240     1250     1260
      *      *      *      *      *      *      *
TCTCATTTATTTATCAAAATTCACATATACAACACCCCGTCCCCAGTGCCCGCAGTTTTTATTAAACA
AGAGTAAATAAATAATGTTTAAAGTGATATGTTGTGGTGGCAGGGTCACGGGCGTCAAAAATAATTTGT

      1270     1280     1290     1300     1310     1320     1330
      *      *      *      *      *      *      *
TAACGTGGGATCTCCACGCGAATCTCGGGTACGTGTTCCGGACATGGGCTCTTCTCCGGTAGCGGCGGAG
ATTGCACCCTAGAGGTGCGCTTAGAGCCCATGCACAAGGCCTGTACCCGAGAAGAGGCCATCGCCGCTC

      1340     1350     1360     1370     1380     1390     1400
      *      *      *      *      *      *      *
CTTCTACATCCGAGCCCTGCTCCCATGCTCCAGCGACTCATGGTCGCTCGGCAGCTCCTTGCTCCTAAC
GAGATGTAGGCTCGGGACGAGGGTACGGAGGTGCTGAGTACCAGCGAGCCGTGAGGGAACGAGGATTG

```

FIGURE 19 CONTINUED

【図19-2】

```

      1410      1420      1430      1440      1450      1460      1470
      *      *      *      *      *      *      *
AGTGGAGGCCAGACTTAGGCACAGCAGATGCCACCACCACCAAGTGTGCCGCACAAGGCCGTGGCGGTA
TCACCTCCGGTCTGAATCCGTGTCGTCTACGGGTGGTGGTGCACACGGCGTGTTCGGGCACCGCCAT

      1480      1490      1500      1510      1520      1530      1540
      *      *      *      *      *      *      *
GGGTATGTGTCTGAAAATGAGCTCGGGGAGCGGGCTTGCAACCGCTGACGCATTGGGAAGACTTAAAGGCAG
CCCATACACAGACTTTTACTCGAGCCCCTCGCCCGAACGTGGCGACTCGGTAAACCTTCTGAATTCGGTC

      1550      1560      1570      1580      1590      1600      1610
      *      *      *      *      *      *      *
CGGCAGAGAAGATGCAGGCAGCTGAGTTGTTGTCTCTGATAAGAGTCAAGAGGTAACCTCCCGTTGGGT
GCCGTCTTCTCTACGTCCGTGCACTCAACAACACAAGACTATTCTCAGTCTCCATTGAGGGCAACGCCA

      1620      1630      1640      1650      1660      1670      1680
      *      *      *      *      *      *      *
GCTGTTAACCGTGGAGGGCAGTGTAGTCTGAGCAGTACTCGTTGCTGCCGCGCGGCCACCAGACATAAT
CGACAATTGCCACCTCCCGTCACATCAGACTCGTCATGAGCAACGACGGCGCGCGGTGGTCTGTATTA

      1690      1700      1710      1720      1730      1740      1750
      *      *      *      *      *      *      *
AGCTGACAGACTAACAGACTGTTCCCTTCCATGGGTCTTTTCTGCAGGCTAGCCGGCCTGAATTCGGATA
TCGACTGTCTGATTGTCTGACAAGGAAAGGTACCCAGAAAAGACGTCCGATCGGCCGGACTTAAGCCTAT

      1760      1770      1780      1790      1800      1810      1820
      *      *      *      *      *      *      *
TCCAAGCTTGATGAATAAAAGATCAGAGCTCTAGTGATCTGTGTGTTGGTTTTTGTGTGCTCGAGCCCC
AGGTTCGAACTACTTATTTCTAGTCTCGAGATCACTAGACACACAACCAAAAACACACGAGCTCGGGG

      1830      1840      1850      1860      1870      1880      1890
      *      *      *      *      *      *      *
AGCTGGTTCCTTTCCGCCCTCAGAAGCCATAGAGCCACCAGCATCCCCAGCATGCCCTGCTATGTCTTCCCA
TCGACCAAGAAGGCGGAGTCTTCGGTATCTCGGGTGGCGTAGGGGTGCTACGGACGATAACAGAAGGGT

      1900      1910      1920      1930      1940      1950      1960
      *      *      *      *      *      *      *
ATCCTCCCCCTTGCTGTCTGCCCCACCCACCCCAAGTAAAGATGACACCTACTCAGACAATGCGGAT
TAGGAGGGGGAACGACAGGACGGGTGGGGTGGGGGTCTTATCTTACTGTGGATGAGTCTGTTACGCTA

      1970      1980      1990      2000      2010      2020      2030
      *      *      *      *      *      *      *
GCAATTCCTCATTTTATTAGGAAAAGACAGTGGGAGTGGCACCTTCCAGGGTCAAGGAAGSCACGGGGG
CGTTAAAGGAGTAAATAATCCTTTCCTGTACCCCTCACCGTGAAGGTCCAGTTCCTTCGGTGCCCCC

      2040      2050      2060      2070      2080      2090      2100
      *      *      *      *      *      *      *
AGGGGCAACAAACAGATGGCTGGCAACTAGAAGGCACAGTCGAGGCTGATCAGCGAGCTCTAGCGGTACC
TCCCGGTTTGTGTCTACCGACCTTGAATCTTCGTGTCTAGTCCGACTAGTCCGCTCGAGATCGCCATGG

```

FIGURE 19 CONTINUED

【図19-3】

```

      2110      2120      2130      2140      2150      2160      2170
      *      *      *      *      *      *      *
GGCATTAGTCTATGGCCGACTCTAGATTTTCTCTTGGCGCCGCCCTAGATGCATGCTCGATCGACCTGC
CCGTAATCAGATACCGGCTGAGATCTAAAGAGGAACGCCGCGGGGATCTACGTACGAGCTAGCTGGAGC

      2180      2190      2200      2210      2220      2230      2240
      *      *      *      *      *      *      *
AGTTGGACCTGGGAGTGGACACCTGTGGAGAGAAAGGCAAAGTGGATGTCATTGTCACTCAAGTGTATGG
TCAACCTGGACCTCACCTGTGGACACCTCTCTTTCCGTTTCACCTACAGTAACAGTGAAGTTCACATACC

      2250      2260      2270      2280      2290      2300      2310
      *      *      *      *      *      *      *
CCAGATCTCAAGCCTGCCACACCTCAAGCTAGCTTGACAACAAAAGATTGTCTTTTCTGACCAGATGGA
GGTCTAGAGTTGGGACGGTGTGGAGTTCGATCGAAGTGTGTTTTCTAACAGAAAAGACTGGTCTACCT

      2320      2330      2340      2350      2360      2370      2380
      *      *      *      *      *      *      *
CGCGGCCACCCCTCAAAGGCATCACCGCGGGCCAGGTGAATATCAAATCCTCCTCGTTTTTGGAAACTGAC
GCGCCGGTGGGAGTTTCCGTAGTGGCGCCCGGTCCACTTTATAGTTTAGGAGGAGCAAAAACCTTTGACTG

      2390      2400      2410      2420      2430      2440      2450
      *      *      *      *      *      *      *
AATCTTAGCGCAGAAGTCATSCCCGCTTTTGAGAGGGAGTACTCACCCCAACAGCTGGCCCTCGCAGACA
TTAGATTCGCGTCTTCAGTACGGGCGAAAACCTCTCCCTCATGAGTGGGGTTGTGACCCGGGAGCGTCTGT

      2460      2470      2480      2490      2500      2510      2520
      *      *      *      *      *      *      *
GCGAATTAATTCCAGCACACTGGCGGCCGTTACTAGTGGATCCGAGCTCGCAAGCTAGCTTGGGTCTCCC
CGCTTAATTAAGGTCTGTGTGACCGCCGCAATGATCACCTAGGCTCGAGCGTTTCGATCGAACCAGAGGG

      2530      2540      2550      2560      2570      2580      2590
      *      *      *      *      *      *      *
TATAGTGAGTCGTATTAAATTCGATAAGCCAGTAAGCAGTGGGTTCTCTAGTTAGCCAGAGAGCTCTGCT
ATATCACTCAGCATAATTAAAGCTATTCGGTCATTCTGTCACCCAAGAGATCAATCGGTCTCTCGAGACGA

      2600      2610      2620      2630      2640      2650      2660
      *      *      *      *      *      *      *
TATATAGACCTCCACCGTACACGCTACCGCCCATTTGCGTCAATGGGGCGGAGTTGTTACGACATTTT
ATATATCTGGAGGGTGGCATGTGCGGATGGCGGGTAAACGCAAGTTACCCCGCTCAACAATGCTGTAAAA

      2670      2680      2690      2700      2710      2720      2730
      *      *      *      *      *      *      *
GGAAAGTCCCGTTGATTTTGGTGCCAAAACAACTCCCATGACGTCAATGGGGTGGAGACTTGGAAATC
CCTTTGAGGGCAACTAAAACACGGTTTGTGTTGAGGGTAACTGCAGTTACCCACCTCTGAACCTTTAG

      2740      2750      2760      2770      2780      2790      2800
      *      *      *      *      *      *      *
CCCGTGAGTCAAACCGCTATCCACGCCCATTTGATGTAAGTCCAAAACCGCATCACCATGGTAATAGCGAT
GGGCACTCAGTTTGGCGATAGGTGCGGGTAACTACATGACGGTTTTTGGCGTAGTGGTACCATTATCGCTA

```

FIGURE 19 CONTINUED

【図19-4】

```

      2810      2820      2830      2840      2850      2860      2870
      *      *      *      *      *      *      *
GACTAATACGTAGATGTACTGCCAAGTAGGAAAGTCCCATAGGTCATGTACTGGGCATAATGCCAGGCG
CTGATTATGCATCTACATGACSGTTCATCCCTTCAGGGTATTCAGTACATGACCCGTATTACGGTCCGC

      2880      2890      2900      2910      2920      2930      2940
      *      *      *      *      *      *      *
GGCCATTACCGTCATTGACGTCAATAGGGGGCGTACTTGGCATATGATACACTTGATGTACTGCCAAGT
CCCGTAAATGGCAGTAACTGCAGTTATCCCCCGCATGAACCGTATACTATGTGAACATACATGACGGTTCA

      2950      2960      2970      2980      2990      3000      3010
      *      *      *      *      *      *      *
GGGCAGTTTACCGTAAATAGTCCACCCATGACGTCAATGGAAAGTCCCTATTGGCGTTACTATGGGAAC
CCCCGCAAAATGGCATTATCAGGTGGGTAACTGCAGTTACCTTTCAGGGATAACCGCAATGATACCCCTTG

      3020      3030      3040      3050      3060      3070      3080
      *      *      *      *      *      *      *
ATACGTCATTATTGACGTCAATGGGCGGGGTCGTTGGGCGGTCAAGCCAGGCGGGCCATTACCGTAAGT
TATGCAGTAATAACTGCAGTTACCGCGCCCGCAGCAACCCGCCAGTCGGTCCGCCCCGTAAATGGCATTCA

      3090      3100      3110      3120      3130      3140      3150
      *      *      *      *      *      *      *
TATGTAACGCGGGAACCTCCATATATGGGCTATGAACTAATGACCCCGTAATTGATTACTATTAATAACTAG
ATACATTGCGCCTTGAGGTATATACCCGATACTTGATTACTGGGGCATTAACATAATGATAATTATTGATC

      3160      3170      3180      3190      3200      3210      3220
      *      *      *      *      *      *      *
TCAATAATCAATGTCTCTGCATTAAATGAATCGGCCAACGCGCGGGGAGAGGCGGTTTGCCTATTGGGCGCT
AGTTATTAGTTACAGGACGTAAATTACTTAGCCGGTTGCGGGCCCTCTCCGCCAAACGCATACCCCGCA

      3230      3240      3250      3260      3270      3280      3290
      *      *      *      *      *      *      *
CTTCCGCTTCCTCGCTCACTGACTCGGCTCGGCTCGGTCGTTTCGGCTGCGGCGAGCGGTATCAGCTCACTC
GAAGGCGAAGGAGCGAGTGACTGAGCGACGCGAGCCAGCAAGCCGACGCCGCTCGCCATAGTCGAGTGAG

      3300      3310      3320      3330      3340      3350      3360
      *      *      *      *      *      *      *
AAAGGCGGTAATACGGTTATCCACAGAATCAGGGGATAACGCAGGAAAGAATGTGAGCAAAAGGCCAG
TTTCCGCCATTATGCCAATAGGTGTCTTAGTCCCTATTGCGTCCTTTCTTGTAACACTCGTTTTCGGGTC

      3370      3380      3390      3400      3410      3420      3430
      *      *      *      *      *      *      *
CAAAAGGCCAGGAACCGTAAAGGGCCGCTGCTGGCGTTTTCATAGGCTCCGCCCCCTGACGAGC
GTTTTCCGGTCCTTGCGATTTCCTCGGCGCAACGACCGCAAAAGGTATCCGAGCGGGGGGACTGCTCG

      3440      3450      3460      3470      3480      3490      3500
      *      *      *      *      *      *      *
ATCACAAAATCGACGCTCAAGTCAGAGGTGGCGAAACCCGACAGGACTATAAAGATAACAGGCGTTTCC
TAGTGTTTTTAGCTGCGAGTTCAGTCTCCACCGCTTGGGCTGTCTGATATTTCTATGGTCCGCAAGG

```

FIGURE 19 CONTINUED

【図19-5】

```

      3510      3520      3530      3540      3550      3560      3570
      * * * * *
CCCTGGAAGCTCCCTCGTGCGCTCTCCTGTTCCGACCCCTGCCGCTTACCGGATACCTGTCCGCCTTTCTC
GGGACCTTCGAGGGAGCACCGGAGAGGACAAGGCTGGGACGGCGAATGGCCTATGGACAGGGCGGAAGAG

      3580      3590      3600      3610      3620      3630      3640
      * * * * *
CCTTCGGGAAGCGTGCGCTTTCTCAATGCTCAOGCTGTAGGTATCTCAGTTCCGTTGTTAGGTCGTTCCGCT
GGAAGCCCTTCGCACCGCGAAAGAGTTACGAGTGGGACATCCATAGAGTCAAGCCACATCCAGCAAGCGA

      3650      3660      3670      3680      3690      3700      3710
      * * * * *
CCAAAGCTGGGCTGTGTGCACGAACCCCCGTTTCAGCCCGACCGCTGCGCCTTATCCGGTAACTATCGTCT
GGTTCGACCCGACACAGTGTCTTGGGGGCAAGTCCGGCTGGCGACCGCGAATAGGCCATTGATAGCAGA

      3720      3730      3740      3750      3760      3770      3780
      * * * * *
TGAGTCCAAACCGGTAAGACACGACTTATCGCCACTGGCAGCAGCCACTGGTAACAGGATTAGCAGAGCG
ACTCAGGTTGGGCCATTCTGTGCTGAATAGCGGTGACCGTCTCGGTGACCATTTGTCTTAATCGTCTCGC

      3790      3800      3810      3820      3830      3840      3850
      * * * * *
AGGTATGTAGGCGGTGCTACAGAGTTCTTGAAGTGGTGGCCTAACTACGGCTACACTAGAAGGACAGTAT
TCCATACATCCGCCACGATGTCTCAAGAACTTCACCACCGGATTGATGCCGATGTGATCTTCTGTCTATA

      3860      3870      3880      3890      3900      3910      3920
      * * * * *
TTGSTATCTGCGCTCTGCTGAAGCCAGTTACCTTCGGAAAAAGAGTTGGTAGCTCTTGATCCGGCAACA
AACCATAGACCGGAGACGACTTCGGTCAATGGAAGCCTTTTCTCAACCATCGAGAAGTAGGCCGTTTGT

      3930      3940      3950      3960      3970      3980      3990
      * * * * *
AACCACCGCTGGTAGCGGTGGTTTTTTTGTGTTGCAAGCAGCAGATTACGCGCAGAAAAAAGGATCTCAA
TTGGTGGCGACCATCGCCACCAAAAAACAAACGTTCTGCTCTAATGCGCGTCTTTTTTCTAGAGTT

      4000      4010      4020      4030      4040      4050      4060
      * * * * *
GAAGATCCCTTTGATCTTTCTACGGGGTCTGACGCTCAGTGGAAACGAAACTCACGTTAAGGGATTTTGG
CTTCTAGGAACTAGAAAAGATGCCCCAGACTGCGAGTCACTTTGCTTTTGTAGTGCATTTCCCTAAAAAC

      4070      4080      4090      4100      4110      4120      4130
      * * * * *
TCATGAACAATAAACTGCTCTGCTTACATAAACAGTAATACAAAGGGGTGTTATGAGCCATATTCAACGGG
AGTACTTGTATTATTGACAGACGAATGTATTGTGATTATGTTCCCAACAATACTCGGTATAAGTTGCC

      4140      4150      4160      4170      4180      4190      4200
      * * * * *
AAACGCTTTGCTCGAGGCCGCGATTAAATTCACATGGATGCTGATTTATATGGGTATAAATGGGCTCG
TTTGACAGACGAGCTCCGGCGCTAATTTAAGGTTGTACCTACGACTAAATATACCCATATTACCCGAGC

```

FIGURE 19 CONTINUED

【図19-6】

```

      4210      4220      4230      4240      4250      4260      4270
      *      *      *      *      *      *      *
CGATAATGTCGGGCAATCAGGTGCGACAACTCTATCGATTGTATGGGAAGCCCGATGCGCCAGAGTTGTTT
GCTATTACAGCCCGTTAGTCCACGCTGTTAGATAGCTAACATACCCTTCGGGGCTACGCGGTCTCAACAAA

      4280      4290      4300      4310      4320      4330      4340
      *      *      *      *      *      *      *
CTGAAACATGGCAAAGGTAGCGTTGCCAATGATGTTACAGATGAGATGGTCAGACTAAACTGGCTGACGG
GACTTTGTACCGTTTCCATCGCAACGGTTACTACAATGTCTACTCTACCAGTCTGATTGACCGACTGCC

      4350      4360      4370      4380      4390      4400      4410
      *      *      *      *      *      *      *
AATTATGCTCTCTCCGACCATCAAGCATTTTATCCGTACTCCTGATGATGCATGGTTACTCACCCTGC
TTAAATACGGAGAAGGCTGTTAGTTTGGTAAATAGGCATGAGGACTACTACGTACCAATGAGTGGTGACC

      4420      4430      4440      4450      4460      4470      4480
      *      *      *      *      *      *      *
GATCCCCGGGAAAACAGCATTCCAGGTATTAGAAGAATATCCTGATTGAGGTGAAAATATTGTTGATGCG
CTAGGGGCCCTTTTGTGTAAGTCCATAATCTTCTTATAGGACTAAGTCCACTTTTATAACAACCTACGC

      4490      4500      4510      4520      4530      4540      4550
      *      *      *      *      *      *      *
CTGGCAGTGTTCCTGCGCCGGTTGCATTTCGATTCTCTGTTTGTAAATTGTCTCTTTAACAGCGATCGCGTAT
GACCTTCACAAGGACGCGCCAACTAAGCTAAGGACAAACATTAAACAGGAAAATTGTGCTAGCGCATA

      4560      4570      4580      4590      4600      4610      4620
      *      *      *      *      *      *      *
TTCTGCTCGCTCAGGCGCAATCAGCAATGAATAACGGTTTGGTTGATGCGAGTGATTTTGATGACGAGCG
AAGCAGAGCGAGTCCGCGTTAGTGCTTACTTATTGCCAAACCACTACGCTCACTAAACCTACTGCTCGC

      4630      4640      4650      4660      4670      4680      4690
      *      *      *      *      *      *      *
TAATGGCTGGCCTGTTGAACAAGTCTGGAAGAATGCATAAACTTTTGCCATTCTCACCAGGATTCAGTC
ATTACCGACCGGACAACTTGTTCAGACCTTTCCTTACGTATTTGAAAACGGTAAGAGTGGCCCTAAGTCAG

      4700      4710      4720      4730      4740      4750      4760
      *      *      *      *      *      *      *
GTCACCTCATGGTGATTCTCACTTGATAACCTTATTTTGGACGAGGGGAAATTAATAGGTTGTATTGATG
CAGTGAGTACCACTAAAGAGTGAACCTATTGGAATAAAACCTGCTCCCTTTAATTATCCAACATACTAC

      4770      4780      4790      4800      4810      4820      4830
      *      *      *      *      *      *      *
TTGGACGAGTCCGAATCGCAGACCGATACCGAGATCTTGCCATCCTATGGAACCTGCTCGGTGAGTTTTC
AACCTGCTCAGCCTTAGCGTCTGGCTATGGTCTAGAACGGTAGGATACCTTGACGGAGCCACTCAAAAG

      4840      4850      4860      4870      4880      4890      4900
      *      *      *      *      *      *      *
TCCTTCATTACAGAAACGGCTTTTCAAAAATATGGTATTGATAATCCTGATATGAATAAATGCAGTTT
AGGAAGTAATGTCTTTGCCGAAAAGTTTTATACCATAACTATTAGGACTATACCTTATTTAACGTCAAA

```

FIGURE 19 CONTINUED

【図19-7】

```

      4910      4920      4930      4940      4950      4960      4970
      *      *      *      *      *      *      *
CAATTGATGCTCGATGAGTTTTTCTAATCAGAATTGGTTAATTGGTTGTAACACTGGCAGAGCATCATGA
GTAAACTACGAGCTACTCAAAAAGATTAGTCTTAACCAATTAACCAACATTGTGACCGTCTCGTAGTACT

      4980      4990      5000      5010      5020      5030      5040
      *      *      *      *      *      *      *
GCGGATACATATTGAAATGTAATTAGAAAAATAACAANTAGGGGTTCCGCGGCACATTCCCCGAAAAGT
CGCCTAIGTATAAACTTACATAAATCTTTTATTGTTTATCCCCAAGGCGCGTGTAAGGGGCTTTCA

      5050
      *      *
GCCACCTGACGTC
CGGTGGACTGCAG

```

FIGURE 19 CONTINUED

【図20】

```

      10      20      30      40      50      60      70
      *      *      *      *      *      *      *
GCTAGCGCCGCCACCATGGGAATGCAGGTGCAGATCCAGAGCCTGTTTCTGCTCCTCCTGTGGGTGCCCCG
CGATCGCGGCGGTGGTACCCTTACGTCCACGTCTAGGTCTCGGACAAAGACGAGGAGGACACCCACGGGC
      M G M Q V Q I Q S L F L L L L W V P>

      80      90      100     110     120     130     140
      *      *      *      *      *      *      *
GGTCCAGAGGACACACCCCTGTGGAAGGCCGGAATCCTGTATAAGGCCAAGTTCGTGGCTGCCTGGACCCCT
CCAGGTCTCCTGTGTGGGACACCTTCCGGCCTTAGGACATAATCCGGTTCAAGCACCGACCGACCTGGGA
G S R G H T L W K A G I L Y K A K F V A A W T L>

      150     160     170     180     190     200     210
      *      *      *      *      *      *      *
GAAGGCTGCCGCTTTCCTGCTTAGCGATTTCCTTCCTAGCGTGAAGCTGACCCCACTGTGCGTGACCCCTG
CTCCGACGGCGAAAGGACGGATCGCTAAAGAAAGGATCGCACTTCGACTGGGGTGACACGCACTGGGAC
K A A A F L P S D F F P S V K L T P L C V T L>

      220     230     240     250     260     270     280
      *      *      *      *      *      *      *
TATATGGATGACGTGGTGCTGGGAGCCAGCATCATCAACTTCGAGAAGCTGGGACTGTCCAGATACGTGG
ATATACCTACTGCACCACGACCCCTCGGTGCTAGTAGTTGAAGCTCTTCGACCCCTGACAGGTCTATGCACC
Y M D D V V L G A S I I N F E K L G L S R Y V>

      290     300     310     320     330     340     350
      *      *      *      *      *      *      *
CTAGGCTGATCCTGAAGGAGCCCTGTGCACGGCGTGTCCACCCTGCCAGAGACCACCCGTGGTGAGGAGGAC
GATCCGACTAGGACTTCCTCGGACACGTGCCGCACAGGTGGGACGGTCTCTGGTGGCACCACCTCCTCTG
A R L I L K E P V H G V S T L P E T T V V R R T>

      360     370     380     390     400     410
      *      *      *      *      *      *
CGTGTAATATGGAGTGCCTGTGTGGAAGTGGCTGAGCCTGCTGGTGCCCTTTGTGGGTACC
GCACATGATACTCACGGACACACCTTCACCGACTCGGACGACCACGGGAAACACCCATGG
V Y Y G V P V W K W L S L L V P F V G T>

```

FIGURE 20

【図21】

```

10      20      30      40      50      60      70
*      *      *      *      *      *      *
GCTAGCGCGCCACCATGGGAATGCAGGTGCAGATCCAGAGCCTGTTTCTGCTCCTCCTGTGGGTGCCCCG
CGATCGCGCGGTGGTACCCCTTACGTCCACGTCTAGGTCTCGGACAAAGACGAGGAGGACACCCACGGGC
      M G M Q V Q I Q S L F L L L L W V P>

      80      90      100     110     120     130     140
*      *      *      *      *      *      *
GGTCCAGAGGACACACCCTGTGGAAGGCCGAATCCTGTATAAGGCCAAGTTCGTGGCTGCCTGGACCT
CCAGGTCTCCTGTGTGGGACACCTTCCGGCCTTAGGACATATTCGGTTCAAGCACCGACGGACCTGGGA
G S R G H T L W K A G I L Y K A K F V A A W T L>

      150     160     170     180     190     200     210
*      *      *      *      *      *      *
GAAGGCTGCCGCTTTCCTGCCTAGCGATTTCCTTCTAGCGTGAAGCTGACCCCACTGTGCGTGACCCCTG
CTTCCGACGGCGAAAGGACGGATCGCTAAAGAAAGGATCGCACTTCGACTGGGGTGACACGCACTGGGAC
K A A A F L P S D F F P S V K L T P L C V T L>

      220     230     240     250     260     270     280
*      *      *      *      *      *      *
TATATGGATGACGTGGTGGCTGGGAGTGGGACTGTCCAGGTACGTGGCTAGGCTGATCCTGAAGGAGCCTG
ATATACCTACTGCACCACGACCCCTCACCCCTGACAGGTCCATGCACCGATCCGACTAGGACTTCCTCGGAC
Y M D D V V L G V G L S R Y V A R L I L K E P>

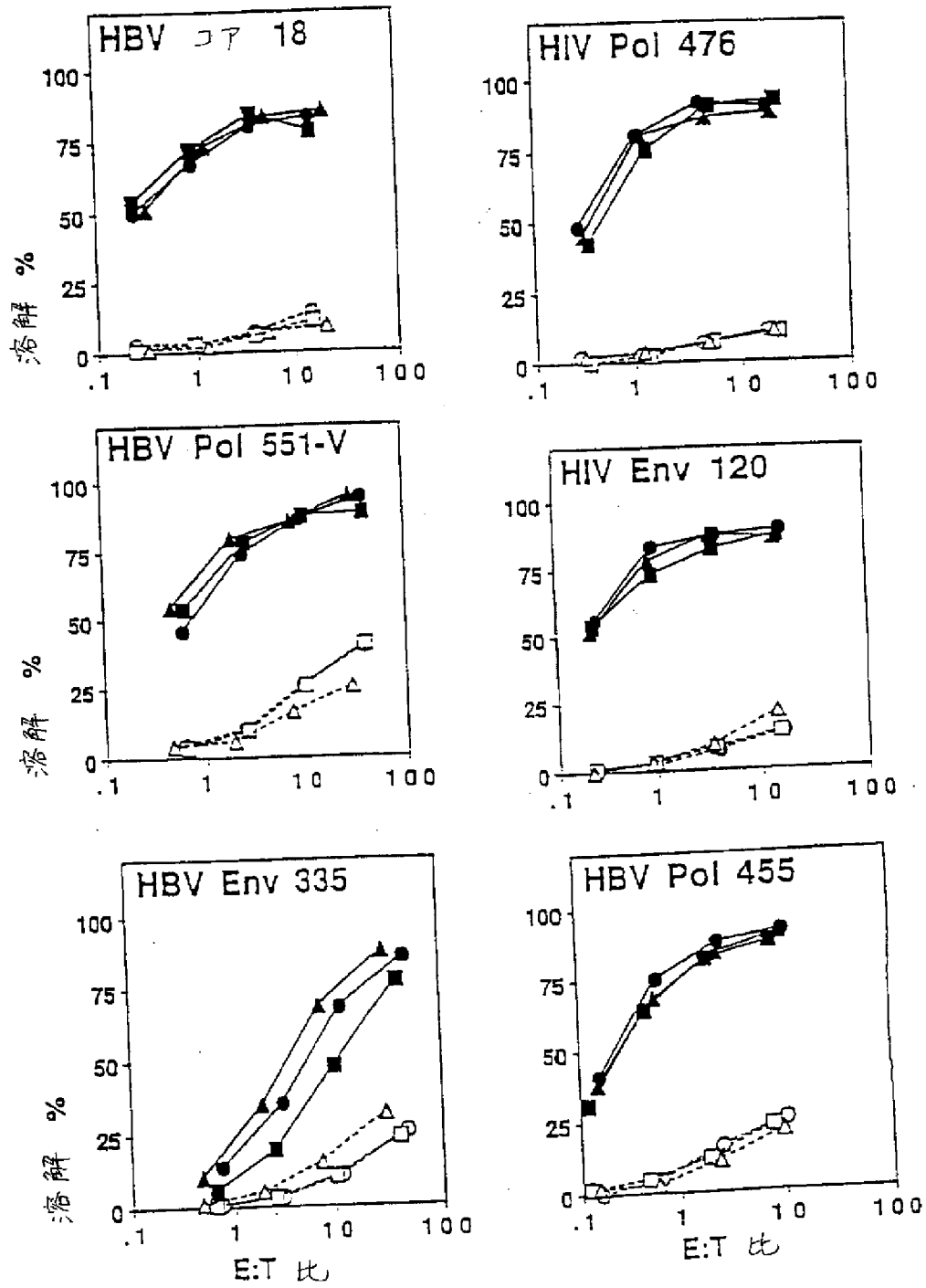
      290     300     310     320     330     340     350
*      *      *      *      *      *      *
TGCACGGCGTGTCCACCCTGCCAGAGACCACCGTGGTGAGGAGGACCGTGTACTATGGAGTGCCTGTGTG
ACGTGCCGCACAGGTGGGACGGTCTCTGGTGGCACCCTCCTCCTGGCACATGATACCTCACGGACACAC
V H G V S T L P E T T V V R R T V Y Y G V P V W>

      360     370     380     390
*      *      *      *
GAAGTGGCTGAGCCTGCTGGTGCCCTTTGTGTGAGGTACC
CTTCACCGACTCGGACGACCAAGGAAACACACTCCATGG
K W L S L L V P F V *>

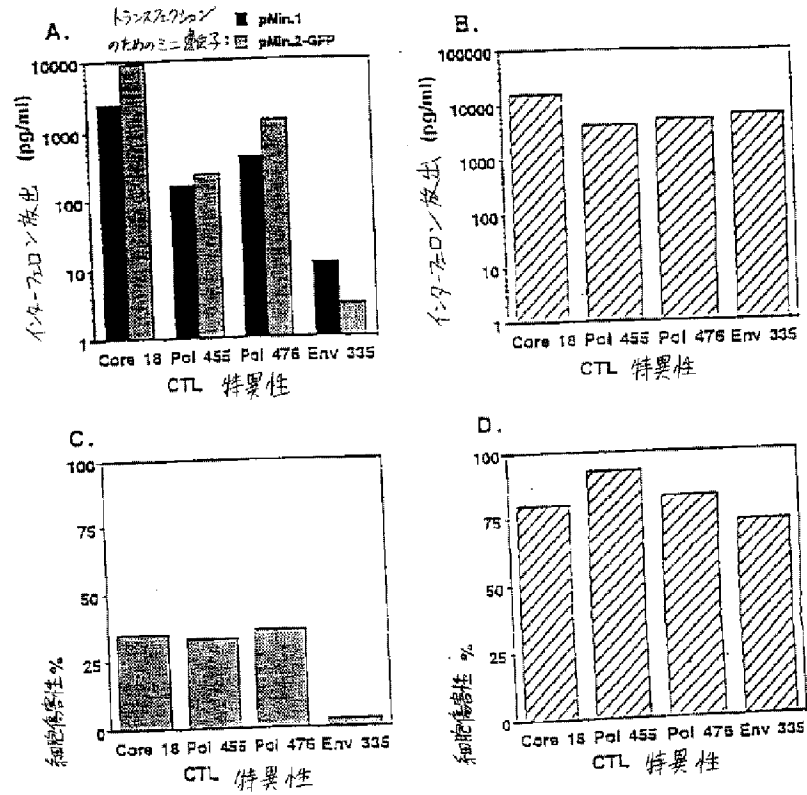
```

FIGURE 21

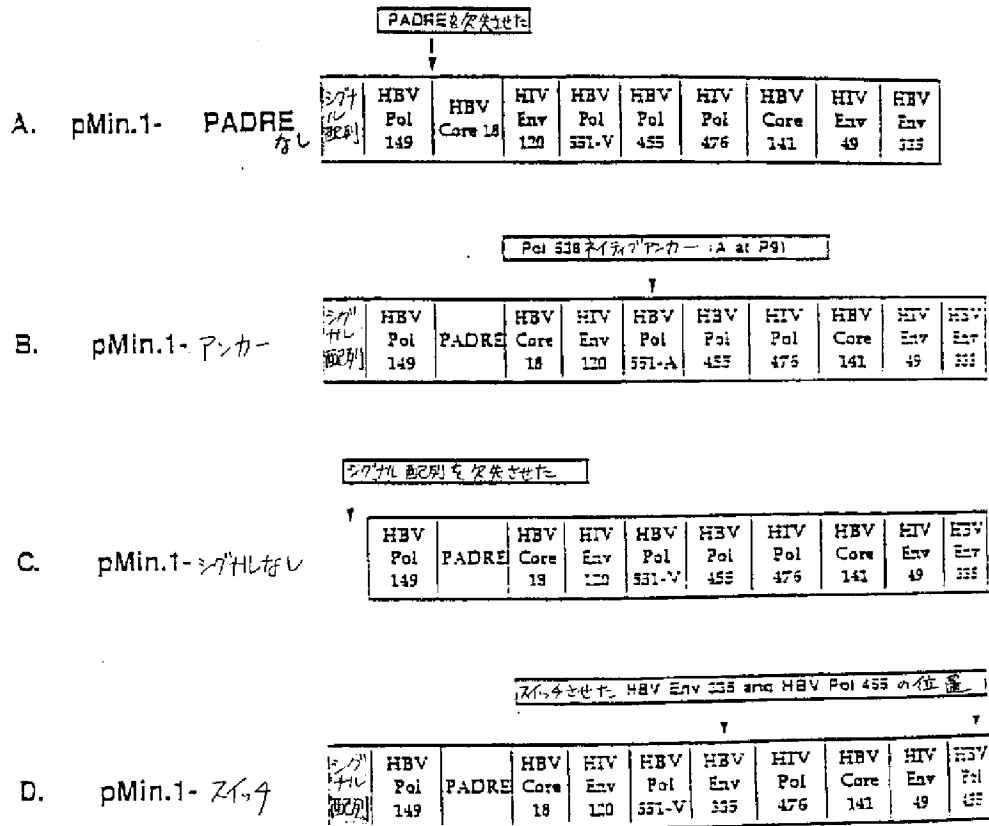
【図22】



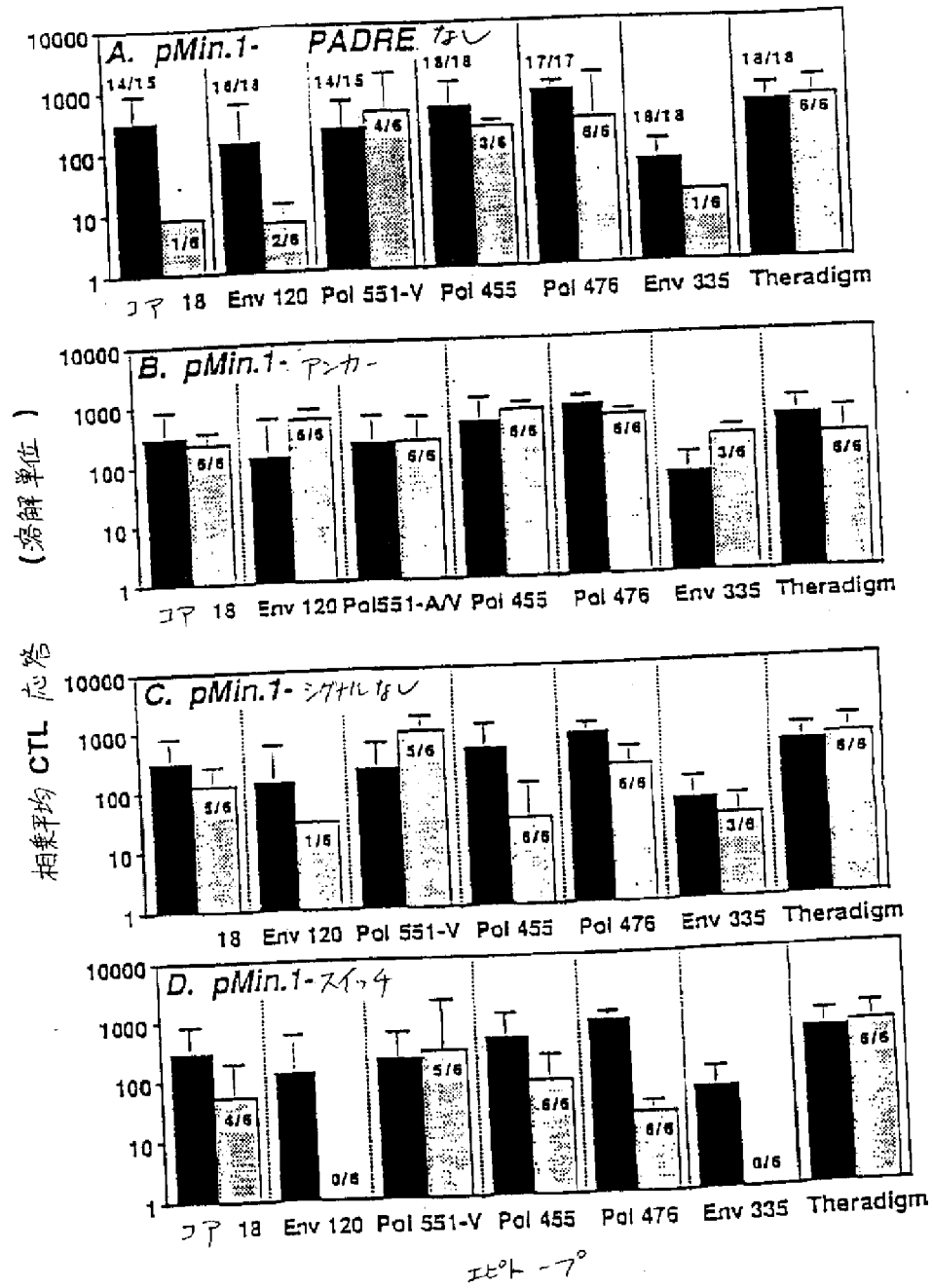
【図23】



【図24】



【図25】



【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No.
PCT/US 99/10646

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
IPC 6 C12N15/85

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
IPC 6 C12N

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 97 35021 A (US HEALTH ; ZAREMBA SAM (US); SCHLOM JEFFREY (US); TSANG KWONG YOK) 25 September 1997 (1997-09-25)	1,3,5, 10,18, 20,22, 27,35, 37,38, 41,48, 49,52, 53,56,64
Y	page 7, line 7 - line 13; claim 35	2-9, 11-17, 19-26, 28-34, 36-40, 42-64
	page 13, line 24 - line 31 --- -/-	

☒ Further documents are listed in the continuation of box C.

☒ Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents :

A document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

E earlier document but published on or after the international filing date

L document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

O document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

P document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

T later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

X document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

Y document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.

B document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

18 February 2000

Date of mailing of the international search report

03.03.00

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5618 Patentaan 2
NL- 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl
Fax: (+31-70) 340-3018

Authorized officer

Sprinks, M

2

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No.
PCT/US 99/10646

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	THOMSON ET AL.: "Targeting a polypeptide protein incorporating multiple class II-restricted viral epitopes to the secretory/endocytic pathway facilitates immune recognition by CD4+ cytotoxic T lymphocytes: a novel approach to vaccine design." JOURNAL OF VIROLOGY (ONLINE), vol. 72, no. 3, March 1998 (1998-03), pages 2246-2252, XP002130251 cited in the application	1,2,13, 18,19, 30,35, 36,44
Y	abstract; figures 1-5; table 1	2-17, 19-34, 36-64
Y	--- WO 95 07707 A (CYTEL CORP) 23 March 1995 (1995-03-23) page 5, line 10	8,9,25, 26,39, 40,54,55
Y	--- WO 95 22317 A (CYTEL CORP) 24 August 1995 (1995-08-24) page 17 page 23 page 25 page 26 page 28	10-12, 27-29, 41-43, 56-58
X	--- AN ET AL.: "A multivalent minigene vaccine, containing B-cell, cytotoxic T-lymphocyte, and Th epitopes from several microbes, induces appropriate responses in vivo and confers protection against more than one pathogen." JOURNAL OF VIROLOGY (ONLINE), vol. 71, no. 3, March 1997 (1997-03), pages 2292-2302, XP002130252 cited in the application	48,49
A	abstract	1-47, 50-64
A	--- WO 97 41227 A (T CELL SCIENCES INC ;THOMAS LAWRENCE J (US)) 6 November 1997 (1997-11-06) page 13 -page 14	1-64
A	--- US 5 633 234 A (AUGUST J THOMAS ET AL) 27 May 1997 (1997-05-27) cited in the application abstract; claim 15	1-64
	--- -/--	

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No.
PCT/US 99/10646

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	ULMER ET AL.: "Presentation of an exogenous antigen by major histocompatibility complex class I molecules." EUROPEAN JOURNAL OF IMMUNOLOGY, vol. 24, no. 7, July 1994 (1994-07), pages 1590-1596, XP002130253 the whole document	13,30, 44,59
P,X	--- ISHIOKA ET AL.: "Utilization of MHC class I transgenic mice for development of minigene DNA vaccines encoding multiple HLA-restricted CTL epitopes." THE JOURNAL OF IMMUNOLOGY, vol. 162, no. 7, 1 April 1999 (1999-04-01), pages 3915-3925, XP000872894 the whole document -----	1-64

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US 99/10646**Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 1 of first sheet)**

This International Search Report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☒ Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
Although claims 18-47 are directed to a method of treatment of the human/animal body, the search has been carried out and based on the alleged effects of the compound/composition.
2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the International Application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful International Search can be carried out, specifically:
3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 2 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this International Search Report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this International Search Report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this International Search Report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.
- ☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No.

PCT/US 99/10646

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 9735021 A	25-09-1997	AU 2535997 A EP 0888456 A	10-10-1997 07-01-1999
WO 9507707 A	23-03-1995	AU 698962 B AU 7873694 A CN 1135181 A EP 0735693 A JP 9505559 T US 5736142 A	12-11-1998 03-04-1995 06-11-1996 09-10-1996 03-06-1997 07-04-1998
WO 9522317 A	24-08-1995	AU 1847395 A AU 2500499 A CA 2183416 A EP 0804158 A	04-09-1995 24-06-1999 24-08-1995 05-11-1997
WO 9741227 A	06-11-1997	AU 2994697 A CA 2250428 A EP 0914427 A	19-11-1997 06-11-1997 12-05-1999
US 5633234 A	27-05-1997	AT 180835 T CA 2154445 A DE 69418856 D DE 69418856 T EP 0680513 A ES 2132395 T JP 8505878 T WO 9417192 A	15-06-1999 04-08-1994 08-07-1999 20-01-2000 08-11-1995 16-08-1999 25-06-1996 04-08-1994

フロントページの続き

(51)Int.Cl. ⁷	識別記号	F I	テーマコード (参考)
A 6 1 K 39/29		A 6 1 P 31/14	
A 6 1 P 31/14		31/16	
31/16		31/20	
31/20		37/02	
37/02		C 1 2 N 15/00	Z N A A
(81)指定国	EP(AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AP(GH, GM, KE, LS, MW, SD, SL, SZ, UG, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), AE, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CU, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MD, MG, MK, MN, MW, MX, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, UA, UG, UZ, VN, YU, ZA, ZW		
(72)発明者	セツト, アレサンドロ アメリカ合衆国 カリフォルニア 92037, ラ ホヤ, リンダ ローザ アベニ ュー 5551		
(72)発明者	イシオカ, グレン ワイ, アメリカ合衆国 カリフォルニア 92075, ソラナ ビーチ, サウス ナード ア ベニュー 725, アパートメント ジェ イ5		
(72)発明者	リビングストン, ブライアン アメリカ合衆国 カリフォルニア 92129, サン ディエゴ, チャコ コート 13555		
(72)発明者	チェスナット, ロバート ダブリュー, アメリカ合衆国 カリフォルニア 92007, カーディフ-バイ-ザ-シー, キング ス クロス ドライブ 1473		
F ターム(参考)	4B024 AA11 AA20 BA31 FA02 4C085 AA03 AA14 BA51 BA69 BA87 BA89 CC04 DD23 DD62 4C086 AA01 AA02 EA16 MA01 MA04 NA14 ZA75 ZB11		

【公報種別】特許法第17条の2の規定による補正の掲載

【部門区分】第1部門第1区分

【発行日】平成17年4月21日(2005.4.21)

【公表番号】特表2002-520000(P2002-520000A)

【公表日】平成14年7月9日(2002.7.9)

【出願番号】特願2000-548449(P2000-548449)

【国際特許分類第7版】

C 1 2 N 15/09

A 6 1 K 31/711

A 6 1 K 39/00

A 6 1 K 39/12

A 6 1 K 39/21

A 6 1 K 39/29

A 6 1 P 31/14

A 6 1 P 31/16

A 6 1 P 31/20

A 6 1 P 37/02

【F I】

C 1 2 N 15/00 Z N A A

A 6 1 K 31/711

A 6 1 K 39/00 H

A 6 1 K 39/12

A 6 1 K 39/21

A 6 1 K 39/29

A 6 1 P 31/14

A 6 1 P 31/16

A 6 1 P 31/20

A 6 1 P 37/02

【手続補正書】

【提出日】平成15年6月20日(2003.6.20)

【手続補正1】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】特許請求の範囲

【補正方法】変更

【補正の内容】

【特許請求の範囲】

【請求項1】

主要組織適合性(MHC)標的化配列をコードする第1のヌクレオチド配列に作動可能に連結されたプロモーターを含む発現ベクターであって、該第1のヌクレオチド配列は2つ以上の異種ペプチドエピトープをコードする第2のヌクレオチド配列に融合され、ここで該異種ペプチドエピトープは、2つのHTLペプチドエピトープまたはCTLペプチドエピトープおよびユニバーサルHTLペプチドエピトープを含む、ベクター。

【請求項2】

前記異種ペプチドエピトープが2つ以上の異種HTLペプチドエピトープを含む、請求項1に記載の発現ベクター。

【請求項3】

前記異種ペプチドエピトープがCTLペプチドエピトープおよびユニバーサルHTLペプチドエピトープを含む、請求項1に記載の発現ベクター。

【請求項 4】

前記異種ペプチドエピトープがさらに1つ以上のCTLペプチドエピトープを含む、請求項2に記載の発現ベクター。

【請求項 5】

前記異種ペプチドエピトープがさらに2つ以上のCTLペプチドエピトープを含む、請求項3に記載の発現ベクター。

【請求項 6】

前記異種ペプチドエピトープがさらに2つ以上のHTLペプチドエピトープを含む、請求項3に記載の発現ベクター。

【請求項 7】

前記HTLペプチドエピトープの1つがユニバーサルHTLエピトープである、請求項2に記載の発現ベクター。

【請求項 8】

前記ユニバーサルHTLエピトープが汎DRエピトープである、請求項3または7に記載の発現ベクター。

【請求項 9】

前記汎DRエピトープが、配列AlaLysPheValAlaAlaTrpThrLeuLysAlaAlaAla（配列番号38）を有する、請求項8に記載の発現ベクター。

【請求項 10】

前記ペプチドエピトープが、B型肝炎ウイルスエピトープ、C型肝炎ウイルスエピトープ、ヒト免疫不全ウイルスエピトープ、ヒトパピローマウイルスエピトープ、MAGEエピトープ、PSAエピトープ、PSMエピトープ、PAPエピトープ、p53エピトープ、CEAエピトープ、Her2/neuエピトープ、またはPlasmodiumエピトープである、請求項1に記載の発現ベクター。

【請求項 11】

前記ペプチドエピトープが表1～8に表されるペプチドからなる群より選択される配列を各々有する、請求項10に記載の発現ベクター。

【請求項 12】

少なくとも1つの前記ペプチドエピトープが、表1～8に示されるペプチドのアナログである、請求項11に記載の発現ベクター。

【請求項 13】

前記MHC標的化配列が、Iiタンパク質、LAMP-I、HLS-DM、HLA-DO、H2-DO、インフルエンザマトリックスタンパク質、B型肝炎表面抗原、B型肝炎ウイルスコア抗原、Ty粒子、Ig- α タンパク質、Ig- β タンパク質、およびIg κ 鎖シグナル配列からなる群より選択されるポリペプチドの一領域を含む、請求項1に記載の発現ベクター。

【請求項 14】

前記発現ベクターが、第2のプロモーター配列をさらに含み、該プロモーター配列は1つ以上の異種HTLペプチドエピトープまたは異種CTLペプチドエピトープをコードする第3のヌクレオチド配列に作動可能に連結されている、請求項1に記載の発現ベクター。

【請求項 15】

前記ベクターがpMin1またはpEP2を含む、請求項1に記載の発現ベクター。

【請求項 16】

前記CTLペプチドエピトープが、HLAスーパータイプについての構造モチーフを含み、それによって該CTLペプチドエピトープは、500nMより大きいアフィニティで該スーパータイプの2つ以上のメンバーに結合する、請求項3または4に記載の発現ベクター。

【請求項 17】

前記CTLペプチドエピトープが、1つより多くのHLA対立遺伝子スーパータイプにつ

いての結合アフィニティーを提供する構造モチーフを有する、請求項 4 または 5 に記載の発現ベクター。

【請求項 18】

哺乳動物被験体においてインビボで免疫応答を誘導するための組成物であって、該組成物は以下：

主要組織適合性 (MHC) 標的化配列をコードする第 1 のヌクレオチド配列に作動可能に連結されたプロモーターを含む発現ベクターであって、該第 1 のヌクレオチド配列は 2 つ以上の異種ペプチドエピトープをコードする第 2 のヌクレオチド配列に融合され、ここで該異種ペプチドエピトープは、2 つの HTL ペプチドエピトープまたは CTL ペプチドエピトープおよびユニバーサル HTL ペプチドエピトープを含む、ベクターを含む、組成物。

【請求項 19】

前記異種ペプチドエピトープが 2 つ以上の異種 HTL ペプチドエピトープを含む、請求項 18 に記載の組成物。

【請求項 20】

前記異種ペプチドエピトープが CTL ペプチドエピトープおよびユニバーサル HTL ペプチドエピトープを含む、請求項 18 に記載の組成物。

【請求項 21】

前記異種ペプチドエピトープがさらに 1 つ以上の CTL ペプチドエピトープを含む、請求項 19 に記載の組成物。

【請求項 22】

前記異種ペプチドエピトープがさらに 2 つ以上の CTL ペプチドエピトープを含む、請求項 20 に記載の組成物。

【請求項 23】

前記異種ペプチドエピトープがさらに 2 つ以上の HTL ペプチドエピトープを含む、請求項 20 に記載の組成物。

【請求項 24】

前記 HTL ペプチドエピトープがユニバーサル HTL エピトープである、請求項 19 に記載の組成物。

【請求項 25】

前記ユニバーサル HTL エピトープが汎 DR エピトープである、請求項 20 または 24 に記載の組成物。

【請求項 26】

前記汎 DR エピトープが、配列 A l a L y s P h e V a l A l a A l a T r p T h r L e u L y s A l a A l a A l a (配列番号 38) を有する、請求項 25 に記載の組成物。

【請求項 27】

前記ペプチドエピトープが、B 型肝炎ウイルスエピトープ、C 型肝炎ウイルスエピトープ、ヒト免疫不全ウイルスエピトープ、ヒトパピローマウイルスエピトープ、MAGE エピトープ、PSA エピトープ、PAP エピトープ、PSM エピトープ、p53 エピトープ、CEA エピトープ、Her2/neu エピトープ、または Plasmodium エピトープである、請求項 18 に記載の組成物。

【請求項 28】

前記ペプチドエピトープが表 1～8 に表されるペプチドからなる群より選択される配列を各々有する、請求項 27 に記載の組成物。

【請求項 29】

少なくとも 1 つの前記ペプチドエピトープが、表 1～8 に表されるペプチドのアナログである、請求項 28 に記載の組成物。

【請求項 30】

前記 MHC 標的化配列が、I i タンパク質、LAMP-I、HLS-DM、HLA-DO、H2-DO、インフルエンザマトリックスタンパク質、B 型肝炎表面抗原、B 型肝炎ウ

イルスコア抗原、T y 粒子、I g - α タンパク質、I g - β タンパク質、および I g κ 鎖シグナル配列からなる群より選択されるポリペプチドの一領域を含む、請求項 18 に記載の組成物。

【請求項 3 1】

前記発現ベクターが、第 2 のプロモーター配列をさらに含み、該プロモーター配列は 1 つ以上の異種 H T L ペプチドエピトープまたは異種 C T L ペプチドエピトープをコードする第 3 のヌクレオチド配列に作動可能に連結されている、請求項 18 に記載の組成物。

【請求項 3 2】

前記ベクターが p M i n . 1 または p E P 2 を含む、請求項 18 に記載の組成物。

【請求項 3 3】

前記 C T L ペプチドエピトープが、H L A スーパータイプについての構造モチーフを含み、それによって該ペプチドエピトープは、5 0 0 n M より大きいアフィニティーで該スーパータイプの 2 つ以上のメンバーに結合する、請求項 20 または 21 に記載の組成物。

【請求項 3 4】

前記 C T L ペプチドエピトープが、1 つより多くの H L A 対立遺伝子スーパータイプについての結合アフィニティーを提供する構造モチーフを有する、請求項 21 または 22 に記載の組成物。

【請求項 3 5】

哺乳動物被験体においてインビボで免疫応答を誘導するための組成物であって、該組成物は、以下：

主要組織適合性 (M H C) 標的化配列をコードする第 1 のヌクレオチド配列に作動可能に連結されたプロモーターを含む発現ベクターであって、該第 1 のヌクレオチド配列は、異種ヒト H T L ペプチドエピトープをコードする第 2 のヌクレオチド配列に融合されている、ベクター

を含む、組成物。

【請求項 3 6】

前記第 2 のヌクレオチド配列がさらに 2 つ以上の異種 H T L ペプチドエピトープを含む、請求項 3 5 に記載の組成物。

【請求項 3 7】

前記第 2 のヌクレオチド配列がさらに 1 つ以上の異種 C T L ペプチドエピトープを含む、請求項 3 5 に記載の組成物。

【請求項 3 8】

前記 H T L ペプチドエピトープがユニバーサル H T L ペプチドエピトープである、請求項 3 5 に記載の組成物。

【請求項 3 9】

前記ユニバーサル H T L エピトープが汎 D R エピトープである、請求項 3 8 に記載の組成物。

【請求項 4 0】

前記汎 D R エピトープが、配列 A l a L y s P h e V a l A l a A l a T r p T h r L e u L y s A l a A l a A l a (配列番号 38) を有する、請求項 3 9 に記載の組成物。

【請求項 4 1】

前記 H T L ペプチドエピトープおよび C T L ペプチドエピトープが、B 型肝炎ウイルスエピトープ、C 型肝炎ウイルスエピトープ、ヒト免疫不全ウイルスエピトープ、ヒトパピローマウイルスエピトープ、M A G E エピトープ、P S A エピトープ、P A P エピトープ、P S M エピトープ、p 5 3 エピトープ、C E A エピトープ、H e r 2 / n e u エピトープ、または P l a s m o d i u m エピトープである、請求項 3 7 に記載の組成物。

【請求項 4 2】

前記ペプチドエピトープが表 1 ～ 8 に表されるペプチドからなる群より選択される配列を各々有する、請求項 4 1 に記載の組成物。

【請求項 4 3】

少なくとも1つの前記ペプチドエピトープが、表1～8に表されるペプチドのアナログである、請求項42に記載の組成物。

【請求項44】

前記MHC標的化配列が、I iタンパク質、LAMP-I、HLS-DM、HLA-DO、H2-DO、インフルエンザマトリックスタンパク質、B型肝炎表面抗原、B型肝炎ウイルスコア抗原、Ty粒子、Ig- α タンパク質、Ig- β タンパク質、およびIg κ 鎖シグナル配列からなる群より選択されるポリペプチドの一領域を含む、請求項35に記載の組成物。

【請求項45】

前記発現ベクターが、第2のプロモーター配列をさらに含み、該プロモーター配列は1つ以上の異種HTLペプチドエピトープまたは異種CTLペプチドエピトープをコードする第3のヌクレオチド配列に作動可能に連結されている、請求項35に記載の組成物。

【請求項46】

前記CTLペプチドエピトープが、HLAスーパータイプについての構造モチーフを含み、それによって該ペプチドエピトープは、500nMより大きいアフィニティーで該スーパータイプの2つ以上のメンバーに結合する、請求項37に記載の組成物。

【請求項47】

前記CTLペプチドエピトープが、1つより多くのHLA対立遺伝子スーパータイプについての結合アフィニティーを提供する構造モチーフを有する、請求項37に記載の組成物。

【請求項48】

非ヒト哺乳動物においてインビボでヒトT細胞ペプチドエピトープのヒトの免疫原性をアッセイする方法であって、該方法は、異種ヒトCTLペプチドエピトープまたは異種ヒトHTLペプチドエピトープをコードする第1のヌクレオチド配列に作動可能に連結されたプロモーターを含む発現ベクターを、該非ヒト哺乳動物に投与する工程を包含する、方法。

【請求項49】

前記第1のヌクレオチド配列が2つ以上の異種CTLペプチドエピトープまたは異種HTLペプチドエピトープをコードする、請求項48に記載の方法。

【請求項50】

前記非ヒト哺乳動物が、ヒトHLA対立遺伝子を発現するトランスジェニックマウスである、請求項48に記載の方法。

【請求項51】

前記ヒトHLA対立遺伝子がA11およびA2.1からなる群より選択される、請求項50に記載の方法。

【請求項52】

前記発現ベクターが、主要組織適合性(MHC)標的化配列をコードする第2のヌクレオチド配列をさらに含む、請求項48に記載の方法。

【請求項53】

前記HTLペプチドエピトープがユニバーサルHTLエピトープである、請求項48に記載の方法。

【請求項54】

前記ユニバーサルHTLエピトープが汎DRエピトープである、請求項53に記載の方法。

【請求項55】

前記汎DRエピトープが、配列AlaLysPheValAlaAlaTrpThrLeuLysAlaAlaAla(配列番号38)を有する、請求項54に記載の方法。

【請求項56】

前記CTLペプチドエピトープまたはHTLペプチドエピトープが、B型肝炎ウイルスエピトープ、C型肝炎ウイルスエピトープ、ヒト免疫不全ウイルスエピトープ、ヒトパピロ

ーマウウイルスエピトープ、MAGEエピトープ、PSAエピトープ、PSMエピトープ、PAPエピトープ、p53エピトープ、CEAエピトープ、Her2/neuエピトープ、またはPlasmodiumエピトープである、請求項48に記載の方法。

【請求項57】

前記CTLペプチドエピトープまたはHTLペプチドエピトープが表1～8に表されるペプチドからなる群より選択される配列を各々有する、請求項56に記載の方法。

【請求項58】

少なくとも1つの前記ペプチドエピトープが、表1～8に表されるペプチドのアナログである、請求項57に記載の方法。

【請求項59】

前記MHC標的化配列が、Iiタンパク質、LAMP-I、HLS-DM、HLA-DO、H2-DO、インフルエンザ、B型肝炎ウイルスコア抗原、Ty粒子、Ig- α タンパク質、Ig- β タンパク質、およびIg κ 鎖シグナル配列からなる群より選択されるポリペプチドの一領域を含む、請求項52に記載の方法。

【請求項60】

前記発現ベクターが、第2のプロモーター配列をさらに含み、該プロモーター配列は1つ以上の異種ヒトCTLペプチドエピトープまたは異種ヒトHTLペプチドエピトープをコードする第3のヌクレオチド配列に作動可能に連結されている、請求項48に記載の方法。

【請求項61】

前記ベクターがpMin.1またはpEP2を含む、請求項48に記載の方法。

【請求項62】

前記CTLペプチドエピトープが、HLA対立遺伝子スーパータイプについての結合アフィニティーを提供する構造モチーフを有する、請求項48に記載の方法。

【請求項63】

前記CTLペプチドエピトープが、1つより多くのHLA対立遺伝子スーパータイプについての結合アフィニティーを提供する構造モチーフを有する、請求項49に記載の方法。

【請求項64】

前記発現ベクターが、HTLペプチドエピトープおよびCTLペプチドエピトープの両方を含む、請求項48に記載の方法。